

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-509565

第6部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)10月19日

(51) Int. Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I
G 0 1 N 33/543	5 9 5	7055-2 J	
21/78	B	8310-2 J	
// G 0 1 N 21/21	Z	7172-2 J	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 47 頁)

(21) 出願番号 特願平6-505280  
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)6月10日  
 (85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)1月31日  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 3 / 0 5 6 7 3  
 (87) 国際公開番号 W O 9 4 / 0 3 7 7 4  
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)2月17日  
 (31) 優先権主張番号 9 2 4 , 3 4 3  
 (32) 優先日 1992年7月31日  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)  
 (81) 指定国 E P (A T , B E , C H , D E ,  
 D K , E S , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M  
 C , N L , P T , S E ) , A T , A U , C A , J P

(71) 出願人 バイオスター、インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国80301コロラド、ボウルダ  
 ー、ルックアウト・ロード6655番  
 (72) 発明者 ボガート、グレゴリー・アール  
 アメリカ合衆国80521コロラド、フォー  
 ト・コリンズ、アシュ・ドライブ1107番  
 (72) 発明者 モデル、ギャレット・アール  
 アメリカ合衆国80304コロラド、ボウルダ  
 ー、ナンバー2、ナインス・ストリート  
 244番  
 (74) 代理人 弁理士 青山 稔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光干渉による分析対象物の検出装置およびその方法

## (57) 【要約】

試験資料中の目的の分析対象物の光学表面を分析する方法および関連器具／装置を開示する。この方法は薄膜このイムノアッセイの使用を必要とし、それによって基質層に関して、分析対象物の結合前後の表面に当る光のスペクトル変化を通して試験試料中に目的の分析対象物を検出する。この装置はその上に当る光に応答する最初の色を有する基質を含む。この基質はまた最初の色とは異なる第2の色を示す。この第2の色は分析対象物がその表面上に存在する時、同じ光に応答して現れる。

## 請求の範囲

1. 下記の手段(i)および(ii)を具備し、光学器具の基体上の被検体の存在もしくは量を検出するような構成で配置される装置：
  - (i)基体に対してブルースター角以外の角度で配置された単色直線偏光源、および
  - (ii)基体から反射される偏光を検出するのに適した位置に、基体に対して該角度で配置されたアナライザー
 (この場合、該アナライザーは、未反応表面に対して該基体上において質量変化が起きたときにアナライザーを透過する該基体からの反射光の強度変化をほぼ最大にするような構成で配置される)。
2. 入射光の角度が、光学活性表面に対する法線から $30^{\circ} \sim 70^{\circ}$ の範囲にある請求項1記載の装置。
3. 検出部の角度が、光学活性表面に対する法線から $30^{\circ} \sim 70^{\circ}$ の範囲にある請求項1記載の装置。
4. 偏光子が、光源に対する全周光点から $0^{\circ} \sim 15^{\circ}$ 離れて配設された請求項1記載の装置。
5. 単色光源の波長が $672\text{nm}$ である請求項1記載の装置。
6. 光源が $540 \sim 650\text{nm}$ の範囲の単波長を有する請求項1記載の装置。
7. 光源が多色であって、フィルターにより単色光源となる請求項1記載の装置。
8. 検出部が単一のフォトダイオードである請求項1記載の装置。
9. 検出部がフォトダイオードアレイである請求項1記載の装置。
10. 光源が本来的に直線偏光される請求項1記載の装置。
11. 光源が、偏光手段を通して直線偏光される請求項1記載の装置。
12. 入射光線と検出部の角度がほぼ等しい請求項1記載の装置。
13. 下記の手段(i)および(ii)を具備する光学装置を、光学器具の基体上の被検体の存在もしくは量を検出するような構成で配置させる工程を含む光学装置
  - (i)光学活性表面から流出する液体を吸収するような構成で配設された第1吸収材を有する台の上に支持された複数の光学活性表面、および
  - (ii)使用時に該光学活性表面と接触するような構成で配設された1または2以上の吸収領域を有する撓動性リッド。
21. 該台に対するリッドの起伏運動を可能にするステップ手段を具備する請求項20記載の装置。
22. リッドが、使用時に該表面への選択的接触を可能にする一連の開閉部を有する請求項20記載の装置。
23. リッドが細長開閉部を有し、台が一連の表示手段を有し、該細長開閉部が該表示手段と協同して装置の使用法を表示する請求項20記載の装置。
24. 被検体がヒト免疫不全ウイルス(HIV)Iおよび/またはIIである請求項24記載の装置。
25. 被検体が連鎖球菌群Aである請求項14記載の装置。
26. 被検体が連鎖球菌群Bである請求項14記載の装置。
27. 被検体がRSVである請求項14記載の装置。
28. 被検体がヘパチスBである請求項14記載の装置。
29. 被検体がクラミジア種である請求項14記載の装置。
30. 被検体がHSVである請求項14記載の装置。
31. 被検体が抗原、抗体、核酸、オリゴヌクレオチド、キレート剤、酵素、バクテリア、ウイルス、ホルモン、環境保全剤、金属、およびこれらの物質に対する受容体である請求項14記載の装置。
32. 光学活性受容面を有する請求項14または20記載の装置。
33. 連鎖球菌群A抗原、連鎖球菌群B抗原、RSV、クラミジアもしくはヘパチスB抗原の存在もしくは量を測定するような構成で配置される請求項14または20記載の装置。
34. 下記の手段(i)および(ii)を具備する光学アッセイ装置：
  - (i)1種の被検体に関して光学活性受容面上の複数の試料を同時にアッセイで

## の分析注:

- (i)基体に対してブルースター角以外の角度で配置された単色直線偏光源、および
  - (ii)基体から反射される偏光を検出するのに適した位置に、基体に対して該角度で配置されたアナライザー
- (この場合、該アナライザーは、未反応表面に対して該基体上において質量変化が起きたときにアナライザーを透過する該基体からの反射光の強度変化をほぼ最大にするような構成で配置される)。
14. 下記の手段(i)および(ii)を具備する光学アッセイ装置：
    - (i)台の上に支持されて第1容器内に保持された活性受容面
 (この場合、第1容器は、該台の基板上に配設されて該受容面から流出する液体を吸収するような構成で配置された第1吸収材を有する)、および
    - (ii)第1容器の一方の側に丁番状に連結され、第2吸収材を有する第2容器(この場合、第2容器は、丁番のまわりの回転によって第1容器へ接近させることができ、これによって第2吸収材は該受容面と接触する)。
  15. 第2容器が、第2吸収材が該受容面と接触する位置に関して第2吸収材を移動させるような構成で配置されたハンドルをさらに具備する請求項14記載の装置。
  16. 第1容器からの第2吸収材の移動を防止するような構成で配置された可動性フラップを第1容器内にさらに具備する請求項14または15記載の装置。
  17. 第2容器からの第2吸収材の移動を防止するような構成で配置された可動性フラップを第2容器内にさらに具備する請求項14または15記載の装置。
  18. フラップが丁番状に第1容器または第2容器に連結される請求項16または17記載の装置。
  19. 各々のフラップが、該受容面もしくは第2吸収材との接触を可能にする開口部を1個または2個以上有する請求項16または17記載の装置。
  20. 下記の手段(i)および(ii)を具備する光学アッセイ装置：
    - きるような構成で配置された光学活性受容面、および
    - (ii)該受容面に対する試料と該受容面とを調合するような構成で配置された自動化試料搬送装置。
  35. 各々のアッセイの結果を測定するための光学読み取り装置をさらに具備する請求項34記載の装置。
  36. 該受容面を乾燥するような構成で配置された吸取手段もしくは送風手段をさらに具備する請求項34記載の装置。
  37. 該装置に適用された試料を定量的に評価する請求項14、20または34記載の装置。
  38. 該装置に適用された試料を定性的に評価する請求項14、20、または34記載の装置。
  39. 基体並びに1または2以上の光学層、付属層および受容層を具備する光学アッセイ装置の製法であって、該層の1つをスピニングする工程を含む該装置の製法。
  40. 基体表面上に光学層をスピニングする工程を含む請求項39記載の製法。
  41. 光学層が二酸化チタン、チタン酸塩、酸化塩素、ポリシリコン、アルミニウムアルキルオキシド、シリケート、ジルコニウム酸化物または酸化塩素から成る請求項40記載の製法。
  42. 層の厚さが $25 \sim 600\text{\AA}$ である請求項40記載の製法。
  43. 下記の工程(i)および(ii)を含む被検体の存在または量の検知方法：
    - (i)突き当たる光線に反応して第1色を青色し、かつ、第1色とは異なる合成光波長を有するかまたは被検体を含有する微生物が光学活性表面上に $50\%$ もしくは $2 \times 10^3$ 個存在するときに第1色と異なる少なくとも1つの光波長の強度を有する第2色を発色する光学活性表面を有する基体を具備する装置を準備し(この場合、第2色は被検体と該装置の接触後、1時間以内に識別可能である)、次いで、

(11)被検体を発光的に含有する試料と該基体を、該基体が前記の量の被検体を含有して前記時間内に第2色を発色する条件下で接触させる(この場合、該装置は、第1色がアナライザーから検出器へ通過する光のバックグラウンド強度になるように配設された周縁アナライザーであり、第2色は、第1色に対するアナライザーから検出器へ通過する光の強度変化となる)。

44. 被検体が下記の群から選択される請求項43記載の方法:

リューマチ因子、カバノキの花粉に特異的なIgE抗体、癌胎児抗原、運輸球菌群A抗原、ウイルス抗原、自己免疫疾患に関係する抗原、アレルゲン、腫瘍もしくは伝染病原体、運輸球菌群B抗原、HIVもしくはHIV II抗原または該ウイルスに感染するホスト、RSVに対して特異的な抗原または該ウイルスに感染するホスト、ヘパチスに対して特異的な抗原または該病原体に感染するホスト。

45. 突き当たる光線に反応して第1色を発色し、かつ、第1色とは異なる合成光波長を有するかまたは光学活性表面上に被検体が存在するときに該光に反応して第1色とは異なる少なくとも1つの光波長の強度を有する第2色を発色する光学活性表面を有する基体を具備し、該基体が、二酸化チタン、チタン酸塩、炭化硅素、ポリシリザン、アルミニウムアルキルオキシド、シリケート、ジルコニウム酸化物または窒化硅素から成るスピニングされた材料から選択された材料を含む光学層を有する、被検体の存在または量の検出装置。

46. 突き当たる光線に反応して第1色を発色し、かつ、第1色とは異なる合成光波長を有するかまたは光学活性表面上に被検体が存在するときに該光に反応して第1色とは異なる少なくとも1つの光波長の強度を有する第2色を発色する光学活性表面を有する基体を具備し、該基体が、 dendrimer、星形高分子、分子自己集合高分子、高分子シロキサンおよび環形成性ラテックスから成る群から選択される材料を含む付属層を具備し、該基体材料が単結晶性シリコン、ガラス、ガラス/無定形シリコン複合材、金属、セラミック、多結晶性シリコン、およびこれらの材料の複合材から成る群から選択され、また、該基体が、二酸化チタン、

51. 光学基体がプラスチックであり、無定形シリコン層の厚さが900~1000nmであり、窒化硅素層、シリコン/二酸化硅素複合材層、チタン酸塩層または二酸化チタン層の厚さが480~520nmであり、付属層が厚さ90~110nmの丁形分枝状アミノアルキルシロキサン層であり、受容材が厚さ30~60nmの抗体層である請求項46または47記載の装置。

52. 光学基体がプラスチックであり、無定形シリコン層の厚さが900~1000nmであり、ガラス上のアルミニウム層の厚さが1900~2100nmであり、窒化硅素層、シリコン/二酸化硅素複合材層、チタン酸塩層または二酸化チタン層の厚さが480~520nmであり、付属層が厚さ90~110nmの丁形分枝状アミノアルキルシロキサン層であり、受容材が厚さ30~60nmの抗体層である請求項46または47記載の装置。

53. 基材層、アルミニウム、クロムまたは透明な伝導性酸化物を含有する伝導性金属層、および無定形シリコン層を有し、該金属層が無定形シリコン層に隣接した多層基体を具備する被検体の光学アッセイ用装置。

54. 基材層および該基材層に隣接した無定形シリコン層を具備する被検体の光学アッセイ用装置。

55. 基体の上面面に付着し得る光学材料を含有する該上面面に付着した反射防止層、および該上面面から最も離れた位置に配設された材料であって、被検体中の被検体に対して特異的に結合する材料から選択される受容材をさらに具備する請求項53または54記載の装置。

56. 付属層が光学材料と受容材の間に介在する請求項55記載の装置。

57. 突き当たる光線に反応して第1色を発色し、かつ、第1色とは異なる合成光波長を有するかまたは被検体を含有する検生物が光学活性表面上に50fgもしくは $2 \times 10^4$ 個存在するときに第1色と異なる少なくとも1つの光波長の強度を有する第2色を該光に反応して発色する光学活性表面を有する基体を具備する被検体の存在または量の検出装置。

58. 突き当たる光線に反応して第1色を発色し、かつ、第1色とは異なる合

成光波長を有するかまたは光学活性表面上に被検体が存在するときに該光に反応して第1色とは異なる少なくとも1つの光波長の強度を有する第2色を発色する光学活性表面を有する基体を具備する、被検体の存在もしくは量の検出装置。

47. 下記の手段(i)~(iv)を具備する被検体の光学アッセイ装置:

(i)ガラス、プラスチック、シリコンおよび無定形シリコンから選択される基体、

(ii)窒化硅素、シリコン/二酸化硅素複合材、チタン酸塩、炭化硅素、ダイヤモンド、炭化カドミウムおよび二酸化チタンから選択される反射防止層、

(iii)高分子シラン、シロキサン、環形成性ラテックスおよび dendrimer から選択される付属層、および

(iv)被検体に対して特異的な結合層。

48. 光学基体がガラスであり、無定形シリコン層の厚さが900~1000nmであり、該ガラス上に配設されたアルミニウム層の厚さが1900~2100nmであり、窒化硅素層、シリコン/二酸化硅素複合材層、チタン酸塩層または二酸化チタン層の厚さが480~520nmであり、付属層が厚さ90~110nmの丁形分枝状アミノアルキルシロキサン層であり、受容材が厚さ30~60nmの抗体層である請求項46または47記載の装置。

49. 光学基体が単結晶性シリコンであり、窒化硅素層、シリコン/二酸化硅素複合材層、チタン酸塩層または二酸化チタン層の厚さが480~520nmであり、付属層が厚さ90~110nmの丁形分枝状アミノアルキルシロキサン層であり、受容材が厚さ30~60nmの抗体層である請求項46または47記載の装置。

50. 光学基体がガラスであり、無定形シリコン層の厚さが900~1000nmであり、窒化硅素層、シリコン/二酸化硅素複合材層、チタン酸塩層または二酸化チタン層の厚さが480~520nmであり、付属層が厚さ90~110nmの丁形分枝状アミノアルキルシロキサン層であり、受容材が厚さ30~60nmの抗体層である請求項46または47記載の装置。

合成光波長を有するかまたは光学活性表面上に被検体が存在するときに該光に反応して第1色とは異なる少なくとも1つの光波長の強度を有する第2色を発色する光学活性表面を有する基体を具備し、該基体がガラス/無定形シリコン複合材またはプラスチック/無定形シリコン複合材から成る群から選択される材料である被検体の存在または量の検出装置。

59. 基体が光学活性表面を保持するか、またはそれ自体が光学的に活性である請求項58記載の装置。

60. 基体がガラスおよびプラスチックから成る群から選択され、その表面上に無定形シリコン層を有することによって光学活性表面が形成される請求項58記載の装置。

61. 光学活性表面が単結晶性のシリコンまたは金属を含む請求項58記載の装置。

62. 金属を含む基体が無定形シリコン層をさらに具備する請求項58記載の装置。

63. 基体の上面面に付着し得る光学材料を含んで該上面面に付着した反射防止層、および該上面面から最も離れた位置に配設された材料であって、被検体中の被検体に対して特異的に結合する材料から選択される受容材をさらに具備する請求項52または53記載の装置。

64. 反射防止層が窒化硅素、シリコン/二酸化硅素複合材、ダイヤモンド、炭化硅素、炭化カドミウムおよびシリコンオキシナイトライドから成る群から選択される材料を含む請求項63記載の装置。

65. 基材がガラス、熔融シリカ、プラスチック、半導体、セラミックおよび金属から成る群から選択される材料であって、硬質または可換性であってもよい材料である請求項53または54記載の装置。

66. 基体が光学活性表面を保持するか、またはそれ自体が光学的に活性である請求項53または54記載の装置。

67. 基体がガラスおよびプラスチックから成る群から選択される材料であっ

て、無定形シリコン層をさらに具有する請求項53または54記載の装置。

68. 光学活性表面が導電性のシリコンまたは金属を含む請求項53または54記載の装置。

69. 金属を含む基体が無定形シリコン層をさらに具有する請求項53または54記載の装置。

70. 被検体が下記の群から選択される請求項43記載の方法：

尿、血清、血漿、腎臓液、たん、全血、唾液、泌尿生殖器系分泌液、糞便抽出液、心臓洗浄物、胃洗浄物、胆嚢洗浄物、膀胱洗浄物、結腸洗浄物、鼻腔/咽喉洗浄物、呼吸器分泌物および腸分泌物。

71. 被検体が下記の群から選択される請求項46記載の装置：

遠端球部B、RSV、クラミジア科、1または2以上のヘパチス抗原、HAV、HBV、HCV、HDVもしくはHEV、1または2以上のHIV抗原、LPS抗原、クラミジアに対して特異的なLPS、ヘパチス、HAV、HBV、HCV、HDVもしくはHEVに対する1または2以上の抗体、HIVに対する1または2以上の抗体。

72. 基体が、抗原抗体の付着を促進する非特異性タンパク質層をさらに具有する請求項46記載の装置。

73. 基体が、信号の発生を改善する非特異性タンパク質層をさらに具有する請求項46記載の装置。

74. 被検体の結合が変色によって検知される請求項72または73記載の装置。

75. 被検体の結合がELISAによって検知される請求項72または73記載の装置。

76. 被検体の結合がRIAによって検知される請求項72または73記載の装置。

77. 被検体の結合が蛍光または化学発光によって検知される請求項72または73記載の装置。

(iii) 試料を室温下で光学活性表面と5〜10分間接触させ、

(iv) 光学活性表面上の試料スポットに2次抗体複合体を1〜10分間接触させた後、洗浄と乾燥処理をおこない、

(v) 基体を室温下で光学活性表面と10〜15分間接触させた後、洗浄と乾燥処理をおこない、次いで、

(vi) 変色を測定する。

89. 変色が干渉効果によって引き起こされる請求項88記載の方法。

90. 変色をエリブソメーターによって観測する請求項88記載の方法。

91. 変色を比較エリブソメーターによって観測する請求項88記載の方法。

92. 変色を分光アナライザーによって観測する請求項88記載の方法。

93. 変色を反射率計によって観測する請求項88記載の方法。

94. 抽出試液が、ケノデオキシコール酸(CDOC)を約0.1%含有するリン酸緩衝液食塩水から成り、NaOHで最終pHが約11.5になるようにアルカリ性化された試液である請求項88記載の方法。

95. 中和試液がリン酸緩衝液である請求項88記載の方法。

96. 下記の工程(i)および(ii)を含む光学表面の分析法：

(i) 偏光子を、光学活性表面に対してあらかじめ決められた角度で検出器に平行に配置させ、次いで、

(ii) 未反応光学活性表面を用いて予備検出器の偏光子を入射光に対してゼロにセットする。

97. 反射性固体、光学支持体、および適当な光源による励起によって蛍光信号を発生する標識を具備し、該支持体が、デンドリマー、星形高分子、分子自己集合性高分子、高分子シロキサンおよび膜形成性ラテックスから成る群から選択される材料を含む付着層を有し、また、該支持体が、固定化された蛍光標識化合物に対して高単位の励起光子を付与し、さらに、該支持体が蛍光信号の増強性を高める、被検体の存在または量の検出装置。

98. 反射性固体、光学支持体、および適当な光源による励起によって蛍光信

78. 被検体が、基体との非特異的相互作用によって増強される請求項46記載の装置。

79. (i) 光学活性表面に対する親水の相互作用による抗原の付着を促進する膜形成性ラテックス、高分子シロキサン、分子自己集合性高分子、星形高分子およびデンドリマーから成る群から選択される付着層および(ii) 非特異性タンパク質層を具有する、クラミジアもしくはグラム陰性バクテリア抗原の固定用装置。

80. 抽出抗原を潜在的に含有する試料を、下記の層(i)および(ii)をさらに具有する光学活性表面と接触させることを含む、クラミジアもしくはグラム陰性バクテリア抗原の測定方法：

(i) 光学活性表面に対する親水の相互作用による抗原の付着を促進する膜形成性ラテックス、高分子シロキサン、分子自己集合性高分子、星形高分子およびデンドリマーから成る群から選択される付着層および(ii) 非特異性タンパク質層。

81. 抗原がLPSである請求項79または80記載の装置。

82. 抗原が主要な外層膜タンパク質である請求項79または80記載の装置。

83. 発色信号が変色である請求項79または80記載の装置。

84. 信号がELISAから発生される請求項79または80記載の装置。

85. 信号がRIAから発生される請求項79または80記載の装置。

86. 信号が蛍光または化学発光から発生される請求項79または80記載の装置。

87. 被検体が光学活性表面へ非特異的に吸着される請求項46記載の方法。

88. 下記の工程(i)〜(vi)を含むクラミジアもしくはグラム陰性バクテリア抗原の測定方法：

(i) 被検体を含有すると推定される試料を抗原抽出試液と混合することによって抽出処理を5〜10分間おこない、

(ii) 系の最終的なpHを7.0〜7.5に調整するのに十分な量の中和緩衝液を添加し、

号を発生する標識を具備し、該支持体が、酸化珪素、シリコン/二酸化珪素複合材、シリコンオキシニトリド、二酸化チタン、チタン酸塩、ダイヤモンド、ジルコニウム酸化物および炭化珪素から成る群から選択される材料を含む光学増強またはAR膜を有し、該膜が励起光の反射を防止するように選定され、該支持体が固定化された蛍光標識に対して高単位の励起光子を付与し、また、該支持体が蛍光信号の増強性を高める、被検体の存在または量の検出装置。

99. 反射性固体、光学支持体、および適当な光源による励起によって蛍光信号を発生する標識を具備し、該支持体が、デンドリマー、星形高分子、分子自己集合性高分子、高分子シロキサンおよび膜形成性ラテックスから成る群から選択される材料を含む付着層を有し、また、該支持体が、酸化珪素、シリコン/二酸化珪素複合材、シリコンオキシニトリド、二酸化チタン、チタン酸塩、ダイヤモンド、ジルコニウム酸化物および炭化珪素から成る群から選択される材料を含む光学増強またはAR膜を有し、さらに、該支持体が、導電性シリコン、ガラス/無定形シリコン複合材、金属、セラミック、多結晶性シリコンおよびこれらの複合材から成る群から選択される材料から成り、該膜が励起光の反射を防止するように選定され、さらにまた、該支持体が、固定化された蛍光標識に対して高単位の励起光子を付与すると共に、蛍光信号の増強性を高める、被検体の存在または量の検出装置。

100. 蛍光標識が、生物学的に活性な受容体に導入された染料である請求項97から99いずれかに記載の装置。

101. 支持体が、デンドリマー、星形高分子、分子自己集合性高分子、高分子シロキサンおよび膜形成性ラテックスから成る群から選択される材料を含む付着層を具有する請求項97から99いずれかに記載の装置。

102. 支持体が、酸化珪素、シリコン/二酸化珪素複合材、シリコンオキシニトリド、二酸化チタン、チタン酸塩、ダイヤモンド、ジルコニウム酸化物および炭化珪素から成る群から選択される材料を含む光学増強またはAR膜を具有する請求項97から99いずれかに記載の装置。

103. 支持体が、単結晶性シリコン、ガラス/無定形シリコン複合材、セラミック、多結晶性シリコン、ガラス、金属およびこれらの複合材から成る群から選択される材料である請求項97から99いずれかに記載の装置。

104. 支持体が光反射性である請求項103記載の装置。

105. 被検体を受容する受容層であって、被検体に対して特異的に結合するパートナーを含む受容層をさらに具有する請求項97から99いずれかに記載の装置。

106. 受容層が抗体である請求項105記載の装置。

107. 受容層が核酸である請求項105記載の装置。

108. 受容層が酵素基質である請求項105記載の装置。

109. 受容層が下記の群から選択される物質から形成される請求項105記載の装置:

抗原、抗体、オリゴヌクレオチド、キレート剤、酵素、バクテリア、細菌性ビリ、細菌性酵母状物、核酸、ポリサッカライド、脂質、タンパク質、炭水化物、金属、ウイルス、ホルモン、およびこれらの物質に対するレセプター。

110. 被検体が、抗体、抗原、酵素、ホルモン、ポリサッカライド、タンパク質、脂質、炭水化物、高利および核酸から成る群から選択される物質である請求項97から99いずれかに記載の装置。

111. 被検体が受容材と2次結合試薬との間に介在された請求項108記載の装置。

112. 2次結合試薬が蛍光標識を含有する請求項111記載の装置。

113. 検出器および光源が、試験支持体に対して等角度で配置された請求項97から99いずれかに記載の装置。

114. 光源が単色性または多色性である請求項97から99いずれかに記載の装置。

115. A R線が、発蛍光団に対して特異的な励起波長を消失させるように選定される請求項97から99いずれかに記載の装置。

125. 入射光源と検出器の角度が等角度である請求項118記載の方法。

126. 蛍光性標識が抗体と複合化される請求項118記載の方法。

127. 蛍光性標識が酵素基質を含有する請求項118記載の方法。

128. 蛍光性標識が核酸プローブを含有する請求項118記載の方法。

116. 入射光源と検出器の角度が等角度である請求項97から99いずれかに記載の装置。

117. 検出器が試験表面に対して任意の角度で配置された請求項97から99いずれかに記載の装置。

118. 下記の工程(I)および(II)を含む試験中の被検体の存在または量の検出法:

(I)反射性固体、光学支持体、および適当な光源による励起によって蛍光信号を発生する標識を準備し(この場合、該支持体は、 dendrimer、 星型高分子、分子自己集合性高分子、高分子シロキサンおよび膜形成性ラテックスから成る群から選択される材料を含む付属層を具有し、また、蛍光信号の強度性と励起単位を高める)、次いで、

(II)該支持体および被検体を潜在的に含有する試料を、該被検体と支持体との相互作用によって支持体と標識に蛍光信号を発生させる条件下において接触させる。

119. 被検体を受容材と2次結合試薬との間に介在させる請求項118記載の方法。

120. 被検体をその結合性によって直接的に検出する請求項118記載の方法。

121. 被検体を、受容材に対する信号発生試薬との比較によって検出する請求項118記載の方法。

122. 被検体を間接的な信号発生によって検出する請求項118記載の方法。

123. 試料が下記の群から選択される請求項118記載の方法:

尿、血清、血液、腎臓液、たん、全血、唾液、泌尿生殖器系分泌液、粪便抽出液、心臓洗浄物、胃洗浄物、臓器洗浄物、膀胱洗浄物、腸胃洗浄物、鼻腔/咽頭洗浄物、呼吸器系分泌物および腫瘍分泌液。

124. A R線と、発蛍光団に対して特異的な励起波長を消失させるように選定する請求項118記載の方法。

#### 明細書

#### 光干渉による分析対象の検出装置およびその方法

#### 関連出願

本出願は下記アメリカ特許出願のうちのいずれか一以上の一部継続出願である: Garret Modelら1992年7月31日に出願したアメリカ出願第07/924,243号、Garret Modelら1989年9月18日に出願し現在放棄しているアメリカ出願第07/408,291号の一部継続出願であり現在係属中の、Garret Modelらの1992年4月24日に出願したアメリカ出願第07/873,097号; Jeffrey Etterらが1991年2月11日に出願し現在係属中の、アメリカ出願第07/653,084号; Jeffrey Etterらが1986年2月25日に出願し現在係属中の、アメリカ出願第07/653,052号; Nygrenらが1986年2月25日に出願し現在放棄しているアメリカ出願第07/832,682号の一部継続出願であって現在係属中の、Nygrenらの1988年10月20日に出願したアメリカ出願第07/260,317号; 現在放棄しているアメリカ出願第07/408,296号の一部継続出願であり、1991年3月20日に出願(アメリカ合衆国を指定)のPCT出願US 91/01781号に基づきJeffrey Etterらが1992年7月31日に出願した、アメリカ出願(通称番号);そして本出願はDiana Raulらが1991年10月1日に出願し現在係属中の、ヨーロッパ出願第EP91308968.6号から外国への優先権主張の権利を有する。上記出願(図面を含めて)はすべて本出願の一部を構成しており、参考までにここに組み込んで記載する。

#### 発明の分野

本発明は本装置に照射する光のスペクトル特性を薄膜現象により検知可能に装置させる装置に関する。

#### 発明の背景

「Applied Optics」24巻の472頁(1985年)でSandstromらは、顕微鏡として作

られた一酸化ケイ素および二酸化ケイ素をケイ素の光学的高板に使用することが記載してある。彼らは、膜厚を変えると光学的高板の性質が変わり、膜厚により異なる色調が得られると指摘している。すなわち、膜厚はその色調に関連があり、光学的高板の上面に設ける膜は目に見える色調の変化を生じる。彼らは、散乱モデルを使用して色調の変化を定量化することが可能であること、および「コンピューターモデルを使用して実施した計算によれば、多層構造にしても光学的高板には殆んど碍るところがない。しかし、表面上の生物層 (biolayer) の構造は、光学的高板が主として多層構造内部の界面で決まるので、このような構造での反射は極く僅かしか変化しない。結論をいえば、やや置くべきことに、生物層を検出するための最も敏感な系は単一層コーティングであり、他方その微細な凹凸の用途には誘電率を追加すれば性能を改善することが可能である。」と指摘している。

Sandstromらはさらに、金属酸化物で作った金属上のスライドには欠点があること、および金属イオンの存在すると生化学的用途にはまた有害になる可能性が多いと指摘している。彼らは、理想的な表面上部の誘電率は一酸化ケイ素の膜が周辺雰囲気中で析出する時自然的に形成される2~3nm厚の二酸化ケイ素であること、および40~60nm厚の一酸化ケイ素層上の70~95nm厚の二酸化ケイ素層がガラスまたはプラスチック基板に使用可能であることを指摘している。また彼らは、一酸化ケイ素を選択的にエッチングすること、シクロジメチルシランで二酸化ケイ素表面を処理すること、および抗原および抗体の生物層を適用することにより、一酸化ケイ素のウェッジを形成すると記述している。このウェッジ構造により彼らは偏光解析で膜厚を測定することでき、そして「最大のコントラストは干渉色が紫から青色に変わる約65nmの領域で見られた」と記載している。このような系の感度は、抗体によりタンパク質の抗原を検出する場合に適用しても充分高い値であると指摘している。「デザインは広範囲の用途には充分な感度である。材料のガラス、ケイ素および酸化ケイ素は化学的に不活性で、生化学反応には影響を及ぼさない。上記の測定法を使用すれば別の用途に最適なスライドをデザイン

ンすることができる。このスライドは製造可能で、その品質は保証でき、そして二つのデザインが現在市販されている。感度が良く、融通性があり、かつ低廉なこれらの道具により、免疫学および生化学において簡単な方法の開発が促進されるだろうことを希望している。」と彼らは結論づけている。

「J. Immunol. Methods」59巻の145頁(1983年)でHysgrenらは上記のものと同じ系につき記述している。それには、抗人血清(BSA)の検出に特定の抗人血清抗体を使用している。この出版中の第2図によれば、 $10^{-4}$ ng/mlのBSAは16時間の培養で検出可能であるが、 $10^{-6}$ ng/mlのBSAはこの系では検出不可能であったと指摘している。また、彼らは「72時間の培養後、検出限界は低く(1ng/mlに低下)になったが、しかし反応はその後非特異反応には感度がより良好になった」と述べている。アメリカ特許第4,558,012号において、Hysgrenらは、525~600nm範囲の波長の非単色または白色につき層の組合配列を反射を低減させるようにする以外は何も記述していない。

#### 発明の要約

本発明は、試料中の分析対象の存在有無または量を検出するための装置の改良、およびこのような装置を使用する方法の改良を特徴とするものである。従来の装置とは対照的に、本発明の装置は試料中の僅く少量の分析対象を検出することができる。僅か0.1nM、0.1ng/mlまたは $2 \times 10^4$ の生物、あるいは数分間だけの迅速測定で僅か50fgの量まで測定できる。測定の総所要時間は測定手続きの開始から(すなわち、分析対象が装置に接触する時点から)一時間から数分間である。事実、本発明の装置によれば、従来の装置と方法とで連続球藻A抗原の測定等で可能であったより30%以上もより多くの試料を検出できる。本発明は、Sandstromら(上記参照)の記載のものと比較して、より優秀な構成のものを見つけた結果によるものであり、その詳細を以下に説明する。この装置は極めて構成されている。また、これらは色の変化が目視できる場合、特にその色変化が、例えば金色から暗紫色または青色に変化する等、非常に説明し易い場合は有用である。

このように、第一の本発明の特徴は、分析対象の量または存在有無を検知する装置を提供することである。この装置には、これに衝突する光で第一の色調を示す、光学的に活性な表面を有する基板を備えている。この第一の色は光のスペクトル分布によると定義される。また、基板は第一の色とは違った第二の色調を示す(第一の色中に存在する組合せとは違った光の波長の組合せであるか、違ったスペクトル分布であるか、または第一の色中に存在するのとは違った一以上の波長の強度を有する)。このような装置により、0.1ng、0.1nM、0.1ng/ml、50fgまたは $2 \times 10^4$ の生物の量の検出に際し感度良好な方法が得られるのである。事実、好適な具体例による検出量は10倍、100倍または1,000倍とかなり少量まで検出可能である。ある色から他の色への変色は計器または肉眼を使用して測定できる。このような好適な検出結果は上記SandstromおよびHysgrenで記述した装置と比較して可成り進歩しており、かつこの装置を使用しても所望上競争できる。事実、この装置の感度は従来技術を遙かに凌いでおり、本発明の装置および方法が優れている。

「光学的に活性な表面」とは、表面に衝突する光が何かで変えられるような、光学的効果の発生に関与する表面のことである。このような光学的に活性な表面は多色光(例えば白色)のみでなく、単色光(例えば、本質的に偏光されるレーザー光)にも反応するようにできる。本発明の装置は好適にも、不反応テスト表面および反応テスト表面の背景の干渉色と明確な対照を示す、色のシグナルを生じる。テスト面には、試料中の分析対象の量の半定量的測定に対応する、色の種々のシェードまたは強度が生じ、そして目視または計器で測定できる。このような装置により濃度測定系の定量的に検出分析できる。

一具体例として、光学的に活性な表面は非鏡面であるか、または光学的に活性な表面を目視できる非鏡面で透明な層を備える。表面があまり重要に見えない角度を形成するので本発明でこの具体例は有用である。用語の「非鏡面」とは表面が鏡のように作用せず、光に対し散乱することを意味する。一般的に、高さが100nmから100μmの間で変動する不規則表面からなるものである。第一の利点は、

乱反射により光に関し広範囲の角度にわたる色変化が目視できることである。

さらに具体例として、基板には酸化ケイ素、酸化ケイ素、二酸化チタン、オキシ窒化ケイ素または酸化カドミウム等から作った干渉膜が含まれている。この膜は光を干渉させるように作用して特定の光を基板表面に生じさせる。この膜は基板の他の層と相互に作用し、分析対象が装置上にある時は色変化または波長強度の変化が観察できる。より好適な具体例として、分析対象に特有の受容分子を結合させる取付け層を設けられる。シグナルが装置上で降られるように、この取付け層に可成りの受容材料を取付けできるということは本発明では重要である。その他の関連する具体例として、一旦分析対象が取付け層に取付けられると、その他の層が対照物に特定の方法で装置上に析出され、色のシグナルまたはより明確な色のシグナルが得られるような方法で本装置が使用できる。

目視で分析できる装置であることが好ましいが、本発明の装置はまた偏光解析計、反射計、プロフィロメータ、改良形偏光解析計等が使用可能である。

他の関連する面から(下記より詳細に記述する)、本発明の特徴は、上記の装置や本発明で使用する特定の装置を使用する方法、および、各層の最も望ましい厚みが即座に決定できるように、各成分層が種々の厚みで光学的に活性な表面を有する基板を形成することにより本発明の装置を最適使用する方法を提供することにある。

特に、本発明は基板がデンドリマー、スターポリマー、分子状自己集合ポリマー、重合シロキサン、および環形成ラテックスからなる群から選んだ化学品から作製した取付け層を有する装置を特徴とする；基板自体は単結晶性ケイ素、ガラス上に不定形ケイ素、プラスチック上に不定形ケイ素、セラミック、多結晶性ケイ素およびこれら材料の複合物からなる群から選んだ材料で作製する；そして基板には酸化ケイ素、ケイ素/二酸化ケイ素の複合物、オキシ窒化ケイ素、二酸化チタン、チタン酸塩、ダイヤモンド、シリコニウムの酸化物および炭化ケイ素から選んだ材料で作製した光学的薄膜を有する。

特に好適な具体例として、第二の色は分析対象が装置と接触した後一時間以内

に識別できる：分析対象物が0.1nM、0.1ng/ml、50fg、 $2 \times 10^4$ の生物から選んだ量だけ表面に存在する時は、光に対する反応が観察される；表面は鏡面であるか、鏡面でないか、または光学的活性面が見られるようにした鏡面でない表面を有する透明層である；基板は固体の支持体、可換性支持体、プラスチック、ガラス、金属および非金属からなる群から選ばれる；基板は光反射性か光透過性である；光は単色光、多色光、紫外光、赤外光である；分析対象はリウマチ因子、糖花粉に特異的IgE抗体、癌胚抗原、連鎖球菌群A抗原、ウイルス性抗原、自己免疫性病気に関連する抗原、アレルギー、腫瘍または感染性微生物、連鎖球菌群B抗原、HIV IまたはHIV IIの抗原、または前記ウイルスに対する抗体、HSVに特異的抗原またはウイルスに対する抗体、抗体、抗原、酵素、ホルモン、多糖類、蛋白質、脂質、炭水化物、麻薬または核酸、腫瘍の誘因生物、ナイセリア菌感染群A、B、C、YおよびW<sub>1318</sub>、連鎖球菌肺炎、E. coli K1、ハエモヒラス疫菌B、微生物から誘導した抗原、ハプテン、麻薬（許可または免許なしで不法に使用する麻薬を含む）、治療薬、環境用薬剤、および肝炎に特異的抗原からなる群から選ばれる；鏡面でない表面はプロフィロメータで2700から3295の読みである。この値は表面構造の平均ピーク高さでRMS値を除いたものであり、そしてHeNeレーザ光源により測定した表面反射率は約50%以下である；基板はガラス、プラスチックからなる群から選ばれ、その表面に不定形ケイ素の層を設ける。このようにして光学的活性表面が形成される；光学的活性表面は多結晶性ケイ素または金属が含まれる；さらに基板は不定形ケイ素の層を有する金属である；分析対象を受容する受容層は分析対象に特定の結合相手を含んでいる；受容層は抗原、抗体、オリゴヌクレオチド、キレート剤、酵素、バクテリア、バクテリアの繊維、バクテリアの鞭毛、核酸、多糖類、脂質、蛋白質、炭水化物、金属、ウイルス、ホルモン、および前記材料の受容体からなる群から選んだ材料で作製される；第一の色は外観が金色で、第二の色は肉色で外観は紫色または青色である。

他の好適な具体例において、本装置は多色光に対し肉眼で検出できるようなシンボルが得られるよう配列されている；そして光学的顕微鏡は波長に480Åから620Å

の厚みにコートされている；そして分析対象は受容材料と結合剤との間に挟まれている。

その他、本発明の特徴は分析対象の光学的測定で使用する装置を提供することであり、基本材の層、アルミニウム、クロムまたは透明な伝導性酸化物の伝導性金属層、および不定形ケイ素の層、で作られた多層基板が含まれる。ここで金属層は不定形ケイ素の付近に配置される。その他、本装置は、基本材の層（光学的活性層を設けた固体材料）と基本材付近の不定形ケイ素の層とを有する多層構造の基板を備えている。好適な具体例において本装置には基板上面に非反射層を付着させる。この層は、基板上面に付着可能な光学的材料と、基板上面から最も離して位置させかつテストされる流体中で分析対象を結合させる特定の材料から選ばれた受容材料と、を備えている；基本材はガラス、シリカ、プラスチック、半導体、セラミックおよび金属の群から選ばれ、そして堅いか可換性かである；そして取付け層は光材料と受容材料の間に挿入される。

その他、本発明の特徴はガラス、プラスチック、ケイ素および不定形ケイ素から選んだ基板、酸化ケイ素、ケイ素/酸化ケイ素の複合物、チタン酸塩、炭化ケイ素、ダイヤモンド、硫化カドミウムおよび酸化チタンから選んだ非反射層、重合シラン、重合シロキサン、膜形成ラテックスまたはデンドリマーから選んだ取付け層、および分析対象に特定の結合層で作製された、分析対象を検出する光学的測定装置を提供することである。

好適な具体例において、不定形ケイ素層は約900から1100nmの厚みを有する；約1800と2200Åの間の厚みのアルミニウム層がガラス上に設けられる；酸化ケイ素、ケイ素/酸化ケイ素の複合物、チタン酸塩または二酸化チタンの膜は約480から515Åの間の厚みを有する；取付け層は約90から110Åの間の厚みを有する、アミノアルキル-1-機種の有機シロキサンである；そして受容材料は約30から60Åの間の厚みを有する抗体層である。

より好適な具体例で、基板は第一の色から第二の色への変化がいずれも偏光解析計等の計測の出力で指示されるように配列されている；表面から反射または透

過する光の強度が変化し、断片する光は装置で反射され、この反射光は偏円状または直線的に偏光させられる；単色、多色、非偏光、可視、紫外または赤外またはこれらの組合せた光である；基板は光学的に活性な表面を支持するか、それ自身光学的に活性である。

その他、本発明の特徴は試料中の分析対象の存在有無またはその量を検出する方法を提供するものであり、その方法には上記装置を用意する行役と、光学的に活性な表面を分析対象を含んだ試料に接触させる行役とが含まれる。分析対象が活性表面と相互に作用して活性面に第二色が表わされる。第二の色の変化の測定に光学的検取装置が使用される。光学的検取装置は下記計測群のうちの一からなる；偏光解析計、反射計、比較反射計、プロフィロメータ、薄膜分析器またはその改良品である。

好適な具体例につき、分析対象を受容材料（例えば、抗体または抗原）および第二結合剤（例えば、抗体または抗原）の間に挟ませる；分析対象は結合して直接検出される；分析対象は間接的なシグナルの発生で検出される；試料は尿、血清、血液、腎臓液、痰、全血、唾液、尿生組織分泌物、便の抽出物、心臓、胃（gastric）、ペリトネール、胸液分泌物、腸分泌物、および喉の唾液、からなる群から選ばれる；そしてこの方法では反射計を使用して色または強度の測定を行う。

特に好適な具体例による方法では、基板を分析対象を含むテスト試料と接触させる。基板は第二の色を有するものとする；そしてこの装置は、第一の色が特定の波長または光の波長範囲の背景の強度を有し、第二色が第一色に対する一以上の光の波長の強度の変化を表わす反射計のセットである；またこの装置は、第一色が分析器を通り検出器まで通過する光の背景の強度を有し、第二の色が第一色に関連して分析器を通り検出器まで通過する光の強度の変化を表わす偏振分析計のセットである；またこの装置は、第一色が目視可能な干渉光で、第二色が第一色に対する色の変化を表わすものである。

その他、本発明の特徴は基板、一以上の光学的層、取付け層および受容層を有し、これらの層の一以上をスピコーティングした光学的測定装置を提供すること

とにある。

好適な具体例として、この方法は基板の表面に光学的薄膜をスピコーティングする。この膜は、ポリシリザン、酸化アルミニウム、硫酸塩、チタン酸塩、リルコン酸塩およびT-樹脂シロキサン、からなる群に一以上から作製され、そしてこの膜は250から550Åの厚みがある；この方法では装置の光表面に取付け層をスピコーティングし、最も好適には非線形有機重合シロキサン、膜形成ラテックスおよびデンドリマーからなる群の一以上から選んで作製し、厚さが25から250Åであればよい；そして受容材料を取付け層にスピコートまたは溶剤コートする。

他の観点から、本発明の特徴は台の上に支持されかつ第一コンテナ内に保持された活性受容面を有する光学的測定装置を提供することである；ここで第一コンテナは、台の基盤に設けられ、かつ表面からの液ドレンを吸収するように配列された第一吸収材料を備え、第二コンテナは第一コンテナの側面にヒンジ連結されていて第二吸収材料を備えている。ここで第二コンテナはヒンジで回して第一コンテナに閉止することができ、このように閉止することにより第二吸収材料をその表面に接触させる。

好適な具体例として、第二コンテナにはさらに第二吸収材料をこれが表面と接触する位置に押し移動させるように配列したハンドルが設けられている；この装置はさらに第二コンテナ内に可動式フラップを備えており、第二吸収材料が第二コンテナから移動しないように配列されている；フラップは第一または第二コンテナにヒンジ連結され、表面または第二吸収材料に接近できるように一以上の隙間が設けられている。

これに関連して、本発明の特徴はベース上に支持されて複数の光学的活性表面を有する光学的測定装置を提供することである。このベースには表面からの液ドレンを吸収するように配列した第一吸収材料が設けられ、そして移動可能な重みは測定使用中に光学的活性表面に接触するように配列した一以上の吸収区域が設けられている。

## 特表平7-509565 (8)

好適な具体例の装置では、ベースに対して重を階段的移動させるための手段が設けられている。重には一連の開口が設けられ、装置を使用時には表面に選択的に接近できるようにする。重には種々異なる開口がある。ここでベースは一連の印しが設けられ、かつ種々異なる開口は印しと協働して装置の使用法を指示する。分析対象は免疫不全ウイルス(HIV)、IIまたはその組合せ、連鎖球菌群A、連鎖球菌群B、HSV、B型肝炎、クラミジア種、HSV、抗体、抗原、核酸、オリゴヌクレオチド、キレート剤、酵素、バクテリア、ウイルス、ホルモンまたはこれらの受容体である。そして装置は連鎖球菌群A抗原、連鎖球菌群B、HSV、クラミジアまたは肝炎の抗原の存在量を測定できるように配列される。そして光学的活性受容表面を有する。

その他、本発明の光学的測定装置は、一分析対象に対し表面の複数の試料の同時測定ができるように配列した光学的活性受容表面と、表面に試料および高濃度の溶液を分配するように配列した自動採取装置(例えばピペット装置)とを有することを特徴とする。

好適な装置にはさらに各測定の結果の光学的読取り装置を備えている。そして装置には表面を乾燥させるように配列したブロー手段を備えている。そして装置はかけられた試料の定量的かつ定性的評価を提供する。

他の観点から、本発明の特徴は分析対象を検出する方法を提供することである。この方法の行程は、取付け層で一以上の層(特に分析対象と接触する受容材料を感える)を支持して光を反射または透過する基板を有する検出装置を準備し、分析対象が受容材料と結合する条件で分析対象を含んだ試料と装置を反応させ、そしてこの結合分析対象を装置の表面で質量変化させる薬剤と反応させるのである。

好適な具体例において、装置は免疫学的に活性な材料の取付け層を支持する平たい反射性材料の基板を有する。この基板は平坦な反射性材料からなる。基板および取付け層は反射時に放射を偏光させる。薬剤は装置上の質量を増減させる。例えば、薬剤は酵素であるか、または分析対象に特有の第二受容材料に付着される順形成スチレンブタジエンコポリマー等の重合ラテックスがある。最も好適に

は、薬剤は抗バクテリアー抗体ー酵素の複合体を含む共役酵素がよい。薬剤は例えば3,3',5,5'-テトラメチルベンチデンを含む酵素の基板等の沈殿剤により沈殿させる。

これに関連して、本発明の特徴は、分析対象と反応する光学的活性表面を備えるテスト装置を有する分析対象の光学的測定装置を提供することであり、分析対象と反応するようにした薬剤は表面に結合して表面の質量を変える。好適にはこの薬剤は共役酵素または重合ラテックスにする。

その他の観点から、本発明の特徴は試料中の分析対象を検出する方法を提供することにある。その行程は、基板を有し、上下面を有し、かつ基板に結合した抗体の層、試料の分析対象を含んだ一以上の層、分析対象と複合体を形成した共役酵素を有する層を少なくとも一層支持した分析対象含有層、をその上面で支持する薄板の光学的免疫測定装置を準備し、共役酵素を沈殿剤と接触させ、沈殿剤と酵素との相互作用から生成物を沈殿させるに十分な時間だけ放置し、テスト試料中の分析対象の量の指標として、共役酵素層および抗体層の質量変化を光学的に測定する。

好適には、共役酵素にはパーオキシサイド、または抗バクテリアー抗体セイウワジビパーオキシサイドの複合体がよい。またはこの共役酵素はアルカリ性ホスファターゼであり、抗バクテリアー抗体アルカリ性ホスファターゼの複合体を構成する。そして沈殿剤は5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル燐酸塩を含む基板である。

他の観点から、本発明の特徴は分析対象の存在有無またはその量を検出するため光学的装置の基板上に配列した計器を提供することにある。この計器には、基板に対しプリースタの角度以外の角度で配置されて偏光的に偏光する単色光源、および基板からの反射偏光を検知するに連する位置と基板に関連する角度とで配置された分析器を有する。この分析器は、質量変化が非反応面に関する基板で生じる時、分析器を通して透過された基板からの反射光の強度をほぼ最大にするように構成されている。

その他、本発明の特徴は分析対象の光学的測定装置を最適化する方法を提供す

ることにある。その方法の行程は、光学的活性層の選ばれた厚みを有する基板を設け、コーティング上に選ばれた厚みの取付け層を設け、分析対象に対し選ばれた厚みを有する受容層を設け(ここで、光学的活性層、取付け層および受容層の厚さの少なくとも一層を複数の層厚が得られるように変更する。);受容層の質量増加が得られるような条件で分析対象を受容層と接触させ、そして一以上の層の厚さの光学的厚さを測定する。好適には光学的コーティングの厚さは基板の長さにより変化する。

出願人は、クレームした装置の最適化のために有用な一つの特徴は基板上に取付けた非反射層を有しかつ屈折率が解っている、基板を使用することであることを知った。この非反射層は基板上に付着できる材料による一以上の層、上面から最も近い位置にかつテストされる液体中で分析対象と特に結合する材料から選んだ受容材料の一以上の層から構成される。非反射層はそれに近接する基板表面材料の既知の屈折率のほぼ平方根である屈折率を有することおよび装置上の光の波長の1/4の整数倍以下の厚みを有することが大切である。

すなわち、本発明の装置を最適化するためには以前から開発されている数学的アナログズム(「Handbook of Optics」の第3巻参照、Water G. Driscoll and William Vaughan、出版人MacGraw-Hill Book Co.、8-48から8-49頁)から読めることが必要であることを出願人は知見した(「発明の背景」参照)。このように、数学的公式はむしろ感度のよくない装置に有用であろう一般的な厚みの指標を提供するが、本発明の方法は可成りかつ驚くほど高い感度の装置を提供するものである。

本発明の光学的テスト表面の構成に有用な最良の材料および方法が得られる方法の指標を下記に説明する。概して、内視で検出できる着色シグナルの発生によるかまたは機器分析によるかに拘わらず、本発明では分析対象を直接検出するための新鋭な光学的活性テスト面が存在する。これらのテスト面には取付け層を介してテスト面に結合される特定の受容材料が設けられる。このように、本発明では、光学的基板を選定し、分析対象に特有の受容材料を基板上に取付け、

この受容材料を分析対象を含む試料液体と接触させ、それから、第一の色の変化を観察することによりコートされた表面に生じる反射と透過の変化を試験する。

本発明は広範囲に適用でき、そして種々の特定の測定法に採用できる。例えば、本発明の装置は抗原または抗体を検出する免疫測定法に使用可能である。本装置は直接、間接または比較検出計面に使用して、検出の検出のみならず、酵素活性度の測定、有機性小分子の検出(例えば酵素、環境薬剤)にも利用できる。

本発明の特徴はテスト表面が測定を実施するに連していることである。この表面は種々の基板、非反射性材料、取付け材料および受容材料から開発可能である。このような材料はユーザが広範囲にかつ手軽に採用可能である。単一の測定からでも多くのテスト結果が得られ、しかもテストされる多くの分析対象が単一の試料で簡単に得られる。

本発明の装置はまたこの程度の感度を必要としない測定に対しても貢献する性能を提供する。この改善された性能は測定時間の短縮、説明の容易さ、および測定法や手続きの融通性をもたらすように貢献する。

本発明のその他の特徴および利点は下記の好適な具体例の説明およびクレームから明白になるであろう。

### 好適な具体例の説明

最初にまず図面について簡単に説明する。

### 図面

第1図は本発明の装置および方法の中心をなす干渉現象の略図である。

第2図は表面、および非表面または反射性の基板表面の略図である。

第3図は本発明の装置で使用する最適な干渉面を選定する方法の略図である。

第4図は光学的表面への3-アミノプロピルトリエトキシシランの取付け状態を展示したものである。

第5図は本発明の装置の作製に有用な多価シロキサン取付け状態の略図であ



る：ここで、 $R$ は化学的に活性な基の光学的表面に存在するケイ素原子への付着に干渉せず、かつ受容体（生物学的）部分の付着にも干渉しない、多数の基のいずれか一つであり、例えば、このような $R$ 基には第一、第二、第三アミン、アルコール類、エトキシ基、フェニル基および芳香族基等がある。

第6図は計測誤り結果または目視誤り結果に有用である本発明の装置の断面図である。

第7図は、光学的表面に覆物を付与することにより光シグナルが得られかつ強化される本発明の方法の略図である：例えば、ラテックスビードを有する抗体を使用するか、または酵素の抗体を使用して基板上に生成物を析出させる。

第8A～8C図は本発明の装置の斜視図および分解組立て図である：特に、第8A、8B、8Cおよび8D図はそれぞれ装置の平面図、底面図、斜視側面図および側面図、第8E図は測定のために開放した装置の斜視図、第8F図は装置のテスト面分解組立て図、そして第8G図は装置内部の各種構成部品を示す分解組立て図である。

第9A～9E図は本発明の多重テスト装置の斜視図およびその他であり、特に、第9A、9Bおよび9C図はそれぞれ装置の平面図、斜視図および分解組立て図、第9D図は装置の前面図の裏面を示し、そして第9E図は前面面を外した装置の平面図である。

第10図は第8A～8C図に示した装置を使用する方法の各行程を示す略図である。

第11図は第9A～9E図に示したと同じ装置を使用する方法を示す略図である。

第12図は回分サンプリング方式の略図である。

第13図は従来の偏光解析計の光路の略図である。

第14A図は本発明に有用な薄膜分析計の略図であり、単色光源および感光性半導体素子またはアレイを使用する。

第14B図は多色光源および光電子倍增管検出計の略図である。

第15図は従来の偏光解析計の光路の改造型の略図であり、シグナル検出の新機の方法を示す。

第16図は光路長の短い偏光解析計の略図である。

い。このように、概して表面は平坦であり、特別のパターンは与えられていない。しかし、表面は人間の目に有効であるような形やデザインにする。非反応テスト面では装置に入射する白色光を金色光で反射させるが、他方、分析対象と結合する付加物により、反応テスト面は入射白色光を紫または青色で反射させる。金色から紫または青色への変化は反応および非反応テスト表面の干渉の差を表わしている。

第6図は本発明を採用した装置のテスト面の種々の一般的構造を略図で示している。計測誤り装置の場合は表面に基板、取付け層、および受容材料層が設けられ、そして任意に不定形ケイ素および/または金膜も設けられる。これに対し、目視で読み取り得る装置では、取付け層および受容材料層と共に、複合干渉膜を形成した光学的薄膜（または干渉膜）を設ける必要がある。これら種々の層およびその相互作用を具体例を使用して検討する。

#### 基板

表面上の以上の薄膜はその表面で入射光を減衰させ、反射または透過で測定される入射光を変化させる。反射は光が付近の媒体でなく異なる屈折率の媒体に通過するときに生じる。この付近の媒体は通常屈折率が1.0の空気である。透過な一般用語は入射光が入射面以外の側の表面または媒体から離れるプロセスのことである。媒体の透過率は入射光に対する透過光の割合である。反射光と透過光とは共に肉眼で検知でき、また計測で測定できる。本発明では試料中の分析対象の量の尺度として装置内にかかる光の減衰を使用することができる。しかし、装置の実際の構造は反射または透過のモードを希望するかどうか、およびその結果の分析を肉眼でか計測するかによって決まる。このような特定の組み合わせは基板の選定と関係があり、下記で記述する。

#### 反射モード、肉眼による検出

本発明で使用する現象の一例として、アスファルト面で水の上の油を見る時に

第17図は従来の分光法に対する分光測定法における反射性基板の利点の略図である。

第18図は第5世代スターポリマーまたはデンドリマー（分子状自己集合ポリマー）の略図である。

#### テスト装置

偏光解析法、多角反射解析法、干渉分光学諸使用術、プロフィロメトリー、表面プラスモン共鳴、消滅波、およびその他の方式や偏光分析法、反射解析法、分光光学と分光測定法の組合わせ、を含めた多くのタイプの光学的薄膜測定技術が本発明には有用である。本発明はこれらの技術の応用に関するもので、適宜選定した結合材料表面上の分析対象の濃縮固定化による薄膜の厚み、密度または質量の変化を検出して測定するものである。かかる薄膜測定技術は対象物を直接検出または定量化し、従来の固相測定に取って替わるものである。薄膜の技術的課題は、従来の診断その他の測定用具市場の融合に値するような測定用具の開発を妨害していた。

特定の結合層と光学的材料を組み合わせる本発明の装置のテスト表面の構造には種々の重要な特徴がある。より詳細には、特定の結合層を非反射性または干渉性膜と組み合わせるには特別の配慮が要求される。これらの特徴を下記で検討するが、概して、最終的な測定装置への要求ばかりでなく、光学的基板、任意の光学的薄膜や干渉膜や非反射性膜および取付け層と、複合テスト表面に使用される受容材料との間の相互関係をも評価しなければならない。目視/定性的、計測的/定量的、計測的/定性的等のエンドユーザーの所需要素は適宜な感度と性能特性の有用なテスト装置の製造時に選択される。

第1図について説明すると、本発明の一具体例の効用の中核をなす光干渉の一般現象を示してある。この現象は通常テスト装置の観察領域的な表面特性とは無関係である。例えば、この現象により表面から反射する光を変化させるということのみが重要で、表面に図示格子その他の何か特別のパターンを設ける必要がな

減衰される干渉色がある。このような干渉効果は至極一般的なことであり、一片の多層構造薄膜、一片の水、引伸ばしたプラスチック膜またはセッケンの膜で見られる。色の変化は材料の厚さの局所的変化によるものである。水上の油で観察される色は特に濃く、水と油の屈折率の差により肉眼で容易に観察される。水は銀面反射するので色はさらに濃くなる。アスファルト表面は透過光を吸収し逆反射を促して、観察される色調を和らげる傾向がある。肉目は強度の変化よりコントラストに敏感であり、このため、材料を選定する場合は表面にける質量または厚さの変化の結果として良好な対照を示すような色が得られるようすべきである。材料の表面に膜を形成して一以上の波長または波長の帯の反射率を変えるのである。このようなタイプの材料はサングラス、カメラのレンズおよび窓ガラスの製造で使用されている。

テスト面が肉眼で見えるようにデザインされている場合は、光学的基板は屈折率が既知のもので、かつその表面は最上面でのみ反射するものでなければならない。研磨した単結晶性のケイ素、金属およびあるセラミックや黒色ガラスの表面はこの用途に直接適用できる。このような材料は目に見えるシグナルを発生させて、光学的に活性であると考えられる。

ガラスまたはプラスチック等の材料は、この方法で有効に利用する前に別に処理しておく必要がある。ガラス等の材料は上面と背面とで反射する。これを回避しかつこのような材料を使用するため、最上面に膜を付加させなければならない。不定形ケイ素、金属の薄膜、またはこれらの材料の組合わせが使用できる。この場合ガラスは固体の支持体として作用し、観察される色の発生には本質的に関係しない。このため光学的には受け身であると考えられる。

単一の基板材料またはより複雑な構造を使用する時、光学的薄膜または非反射性コーティングを選定するには、最上面の屈折率のみが大である（下記参照）。予め選定した基板に適合する非反射性材料は“Handbook of Optics”第3巻の8-48から8-49頁の計算を参考にすべきである。単結晶性ケイ素はこれを最上面に、透明ガラスはこの表面を不定形ケイ素その他の材料でコートする。非反射性膜の

該庫の調整は下記のウェッジの実験結果を使用して行なう。肉眼で識別できる色の変化を導くために反射性基板を使用する場合、適当な屈折率および厚みの膜を付加することが絶対に必要である。

光学の基板材料は鏡面反射を形成し、またはシグナルを見る場合に角度に依らない乱反射を生じないように処理できる。

#### 透過モード、内視による説明

この方法では、光が表面を透過するので色は反射光中には見られない。このような異なる波長の光の選択的透過はサングラス、カメラレンズ、窓ガラスおよび narrowbandpass フィルターの製造に使用されている。材料が異なる波長の光を選択的に反射および透過する。このフィルターは光の波長の大きな域を反射し、特定の波長を中心した波長の小さな域のみを選択的に透過する。このフィルターは一面を光の多くの波長を反射する材料でコートした光学ガラスで構成されている。このガラスにコートした材料の厚みの変化はフィルターの有用な範囲を変更させる。

このため、光学の基板は光の可視波長に対し透過性がなければならない。このため、単結晶性ケイ素、金属、あるプラスチックおよびセラミックは、極度に薄く透明でなければ適用できない。ガラスおよびある種の透明プラスチックはこの用途には最も有用である。この方法では基板は光学的に活性である。目視できる色の変化を生じさせるためであるので、基板の屈折率は非反射性タイプの膜には逆効果を与える。一以上の透過面でのシグナルの散乱を避けるためこの用途には表面は均一で平滑でなければならない。

不定形ケイ素層が充分薄ければ、この不定形ケイ素層でコートした基板はある角度で可視光線透過できる。このことはガラス基板の非常に薄い金属層でも事実である。このタイプのテスト表面は不定形ケイ素がテストピースの背面（すなわち、目視面の反対側）にあるように配置しなければならない。

リーズなどの材料は、これらの膜の例外（IR）特性の変化を監視するために、この用途に使用することができる。

したがって、「基板」という用語は、以下で述べる層を保持するための固体表面だけでなく、光学薄膜をはじめとする光学活性基板をも含む。明確性を期するために、基板のこれらの2つの部分を別個に論じるが、本発明で重要なことは、層（アタッチメント層およびその他の層が積層される層）が光学的に活性であって、上述のようにこれらの層の厚さまたは質量の検出可能な変化を提供することであることを、当業者は認識されよう。

光学基板は固体材料であるか、あるいは光学的に作用する1層の材料を支持するかのいずれかである。これらの材料は、光学薄膜と結合して干渉効果を生じさせる場合には、既知の屈折率を持たなければならない。したがって、後で述べるように、これは、反射性または反射性にされるどのような所望の材料からでも形成することができる。計器に使用する場合、透過光が分析されるように、基板を透明（例えばガラスやプラスチック）にすることができる。

本発明は、最終使用者のニーズに適合する様々な光学基板の材料および形態の使用に適用している。光学基板は、乱反射または鏡面反射をする材料から形成するか、あるいはそうした材料を基板上に塗布することができ、剛性または可塑性、反射性または透過性のどちらでもよく、試験表面の光学機械コンポーネントを形成することができる。あるいはまた光学的に受動的な支持体として作用すること（および光学活性層を設けること）ができる。計測分析用に設計されたデバイスは基板上に反射防止被覆（光学薄膜）を必要とせず、目視観察用に設計されたものはそうした被覆が必要である。計測用途、または色信号発生用途の目視観察用の光学基板を選択するのに有用な判断基準を、以下に提示する。

ガラス、溶融シリカ、プラスチック、セラミック、金属、および半導体材料をはじめとする広範囲の剛性材料で、光学基板を形成することができる。可塑性光学基板としては、プラスチック等の薄膜がある。大半の基板は、その後の層を基板上に沈積する前に、当業者にとって周知である標準溶剤、プラズマ・エッチン

#### 反射モード、計器による説明

計器による検出を採用する場合は、非反射性または光学の薄膜を使用することは任意である。反射計ではシグナルを生じせるために色が変化するか、または光度（強度）が変化することが要求される。計器では強度の変化を記録し、コントラストのための最大限の変化を必要としないので、この色の変化は目視可能なように選択する場合の色の変化とは異なることである。非反射性薄膜は、分析対象結合の要因としての強度の最大の変化が得られるように調整することが好ましい。さらに、反射計を使用すればまたこれで鏡面反射または乱反射面での色/強度の変化が測定できる。

偏光解析計タイプの計器を使用する場合は、光学の基板は鏡面反射するものにすべきである。反射は最上表面からのみ生じる。既に検討したように、ガラスはこの場合支持体としてのみ作用し、光学的に受け身であるか、検出されるシグナルの発生には関与しない。計器による検出では薄膜との相互作用による光の強度変化を測定する。光はそれがどのような波長の単色光、多色光でも偏光状態または直線的に偏光する。

#### 透過モード、計器解析

入射光に対し透過的であればどの光学基板でも、その入射光が多色光か単色光か、線形偏光か円偏光か、あるいは望ましいどの波長であろうと関係なく、この用途に使用することができる。この用途におけるAR膜の使用は任意であるが、解析計用に必要な場合は、目による解釈のために提示した規則がここでも適用される。したがって、光学基板の屈折率はAR被覆の選択に影響する。屈折計の設計は、反射測定または透過測定を行なえるように容易に変更することができる。

色に関係なく透過光を変化させるときには、AR膜は必要ない。この用途における基板の唯一の要件は、入射光の1つまたは複数の成分が透過することであり、試験片の最上表面の質量または特性が変化すると、透過光が検出可能な方法で変化することである。イーストマン・コダックによって製造されているIritranシ

グ、または酸洗浄が必要なのである。

目視可能な色信号を生ずる場合、反射防止被覆材が必要である。マイラー（ポリエチレン・テレフタレート）および表面エネルギーの低いその他の材料のポリマー膜は、そうした材料にはよく接着しないことがあり、この層が沈着できるようにするには、その前に追加処理が必要になることがある。接着力を改善するために、これらの光学基板は、半導体処理における酸漿プラズマ洗浄で標準的な条件下で、酸漿プラズマでエッチングすることができる。

ガラスや、けい素などの半導体材料、金属等の多くの固体材料の表面は、研磨すると十分に滑らかになり、鏡面反射が得られる。反射による分析に使用する場合、光学基板の選択における重要な要件は、上面だけで反射が発生するか、または発生させられることである。これは、干渉膜をきき、目視観察されるデバイスの場合、特に重要である。これは、当業者に周知の技法で、基板上に薄い金属膜を蒸着し、その後の層を積層を行なうことによって、容易に達成される。例えば、ガラス基板の最上表面は、下層表面からの望ましくない反射を防止するために、層を積層することができる。

#### 金属層

基板を反射モードで使用する場合、基板が部分的または完全に透明であるときは、透過光を遮断し、上層表面だけで反射が起きるようにするために、不透明材料を被覆することができる。例えば、ガラス基板は、アルミニウムを充填したタングステン・ボートに向けて真空チャンバ内に取り付けることによって、アルミニウム、クロム、またはその他の透明な導電性酸化物の層を被覆することができる。チャンバは、 $1 \times 10^{-7}$  トルの圧力にまで真空排気される。タングステン・ボートに電流が流れ、ボートの温度が上昇する。アルミニウムが20 A/秒の率で基板に沈着する速度で100秒間沈着させ、ガラスに2000 Åの厚さを持つ不透明なアルミニウムの層を被覆する。背面反射を防止するために、これより薄いアルミニウムまたはクロムの層を用いることもできる。金属膜の沈着には非導

電沈法を使用することでもできる。

#### アモルファス・シリコン

上述のアルミ被覆ガラスは、光学的に受動的と考えられる。したがって、水素添加アモルファス・シリコン(a-Si:H)の層を被覆すると、基板の光学特性がa-Si:Hのみから決まる。アルミニウム被覆ガラスが必要なのは、アモルファス・シリコン沈積プロセスに導電性表面が必要な場合だけである。アモルファス・シリコンの沈積に導電性表面の使用を必要としない技術が知られている。この基板を生成するには、プラズマ・エンハンス化学蒸着システム内の2つの対する電極の一方に、アルミニウム被覆ガラスを取り付ける。システムを真空排気し、基板を250℃に加熱する。チャンバ内への一定流量のシラン(SiH<sub>4</sub>)ガスを0.5トルの圧力に上昇する。10mW/cm<sup>2</sup>のRF電力を電極に印加することによってプラズマが衝突する。a-Si:Hの膜が基板に沈積し、約75分間で約1000nmの厚さまで成長する。こうして形成されたa-Si:Hは、試験表面の最初の光学機能層を形成することができる。

a-Si:Hだけを被覆した(アルミニウム層を持たない)ガラス基板も本発明に有用である。ガラス、熔融シリカ、サファイヤ、および多くのプラスチックなどの透明な基板は、追加修正を行わずに、計測測定に使用することができる。目視可能な色信号生成は透過性基板を用いて達成でき、被覆の反射防止特性は透過光から決定される。

測定制定に充分な反射表面を持つ基板の多くは、金属から形成される。これらの金属の例として、鉄、ステンレス鋼、ニッケル、コバルト、亜鉛、金、銅、アルミニウム、銀、チタン等、およびこれらの合金がある。金属は、計測検出法を適用するとき、特に有用な基板である。計測測定システムの場合、主な要件は、基板が反射し、平面であることである。対照的に、目視可能な色信号生成の場合、金属の反射率に適切な反射防止被覆を整合させることは、不可能ではないが、非常に難しい。最適な干渉色の生成するために、光学基板の反射率と使用される光

学源とを整合させなければならない。したがって、色生成用に設計されるデバイスは一様に、他の基板から、または前に述べたようにアモルファス・シリコン被覆金属基板から形成される。

#### 非鏡面

図2を参照すると、鏡面基板(表面が鏡状またはほぼ鏡状である基板)を提供するのではなく、むしろ図2に図解的に示し、かつ符号Bで表わすように、表面が不規則な隆起を形成するような方法で製造される本発明の一般概念の略図を示す。これらの隆起は、図ではかなり誇張されているが、一般には1nmから100μmの間の大きさであり、最も望ましくは約100nmから100μmの間である。繰り返すが、これらの隆起は(図解格子の形のように)規則的に設けられたものではなく、表面に入射した光の一般散乱が生じるように設けられたにすぎない。このような隆起を設けることにより、光がどの角度方向から基板に入射するかは重要でなくなり、図1に示す色変化は、基板を人射光または観察する目に対し任意の角度で保持することによって、観察することができる。計測表面および目視可能な色信号生成表面はどちらも、鏡面基板または拡散反射基板により構成することができる。

拡散反射を行なう表面は、物理的研磨、化学的研磨、または材料の塗布など、様々な方法で得ることができる。鏡面基板は、炭化けい素の粒子を含む化合物を用いる物理的研磨によって荒削りして、拡散表面を形成することができる。代替的に、材料を化学的に研磨することもできる。例えば、単結晶シリコン・ウェハは、80℃の30%水酸化カリウム(重量)の水溶液でエッチングして、ピラミッド構造から成る粗表面を形成することができる。研磨工程の後で、当業者に周知の等方性エッチングにより、拡散反射を生じる不規則表面を形成することができる。

基板の拡散特性は、被覆によって生じることもできる。例えば、直径2ミクロンのポリスチレン球を、ポリアミド含有溶液などの液体中に分散させる。ガラ

ス・スライドをスピン・コートに真空降着し、スライドの中心部が溶液で覆われるようにする。スピン・コートのスイッチを3000rpmで数秒間オンにし、溶液中の球を表面全体に均等に分散させる。液体を乾燥させると、拡散反射を生じる表面が得られる。

本発明の実施例は、拡散光反射を生じる不規則表面を持つ光学基板の使用を含む。また、光拡散材料またはテクスチャード・プラスチック(textured plastic)などの光変性材料を被覆したり、上にかぶせたり、またはそれらを介して観察される層からなる光学基板の使用も含む。そうしたプラスチックを介して観察すると、上述と同様の効果を得られる。一例として、光学基板は単結晶から形成され、単結晶を成長させて直径1インチに押し出した後、ダイヤモンド・ソーで切断してウェハにする。このウェハを化学エッチング液で処理して、表面を円滑にし、傷を減少する。このウェハを、タルク・スラリー内のアルミニウム酸化物、チタン酸化物、または炭化けい素の粒子で研磨または研削する。初期粒径は大きく、徐々に小さい粒径を用いて、徐々に円滑な表面にしていく。ウェハの両面にこの処理を施す。最終研磨工程の後、非常に強度の拡散反射表面が得られる。

ウェハの研磨が終了した後、次の工程またはその既知の整形法を用いてウェハを洗浄する。すなわち、ウェハを、陽イオン活性剤で苛洗洗浄し、その後18メガオームの水ですすぎ洗浄する。次に、それらを陰イオン活性剤で洗浄した後、18メガオームの水ですすぎ洗浄する。これらを、370mlの30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、250mlのアンモニア水、および9ガロンの水から成るアンモニア水溶液で超音波洗浄し、0.1ミクロンの濾過水を最終すすぎ水とする多段階の水ですすぎ洗浄する。次にこれらをスピン乾燥させ、光学被覆で覆うようにする。この方法に代わる別の方法として、Polymer Surfaces and Interfaces (edited by V. J. Feast and H. S. Munro, John Wiley and Sons, N.Y., N.Y., page 212, 1987)に記述されている「RCR洗浄」がある。

ガラスの場合、表面特性の程度つまり不規則性は、光沢で評価される。ここで述べた表面の拡散反射能力とは、反射が純粋鏡面反射に比べて散乱する程度であ

る。拡散性は表面トポグラフィの関数であり、相対トポグラフィは干渉縞またはバイオフィルムよりずっと大きいので、あいまいさ(fuzziness)は、異なる特定の割合に対して大きく変化するとは考えられない。目視可能な色信号生成の場合、表面は反射光の強度または色に影響するが、その拡散特性には影響しない。色信号を生成する拡散表面は、反射計に特に便利である。

表面トポグラフィは、デューク<sup>®</sup>(カリフォルニア州サンタモニカ、ソローン・テクノロジー社)などの表面プロフィロメータによって特性化することができる。したがってあいまいさまたは不規則性もしかりである。デューク<sup>®</sup>は、表面特徴間の分離または距離に関する読み、および表面の定義された領域における表面特徴の高さの平均値を提供する。表面の一つの有効な尺度は、二乗平均平方根(RMS)または平均表面粗度を平均ピーク間隔で割った値であり、ピークはRMS粗度の少なくとも50%の高さを持つ突起と定義する。粗度は反射率対角度の関数であるので、反射率の角度依存性を測定することによって定量化することができる。法線から30度で入射する光源の場合、フォトダイオードの反射光の強度は、0度から90度までの角度の関数として測定しなければならない。選択されたウェハは、観察角度範囲全体にわたり円滑に炭化する反射率を示すのが最適である。HeNeレーザー光源を使用した場合、本発明で有用な広い表面からの表面粗度反射率は、研磨ウェハが100%反射すると仮定して、5%未満でなければならない。

本発明の一実施例では、非鏡面つまり不規則な表面を持つ品物は、約2700から3295の間のピーク値によって特徴付けられ、好適な固定値は約2895である。この値は、RMS粗度をテクスチャの平均ピークで割った値を表わす。

研磨処理の他に、広範囲な化学またはプラズマ・エッチング技術が、基板の拡散特性を得るのに適している。例えば、ガラスは、つや消しガラスの製造時に使用されるHFエッチングを利用して、拡散光反射表面に定めることができる。

色信号生成の場合、基板選択は、その後の被覆段階に使用される反射防止材の特性を決定する。以下に、初期基板選択に基づく反射防止材の選択について述べ

る。

基板材料は、切断、ソーイング、スクライビング、レーザ・スクライビング、またはその他の方法で処理して所望の試験片の形状にすることができる。単独使用分析に適した試験片は、 $0.5\text{ cm}^2$ ないし $1\text{ cm}^2$ であり、好適には $0.75\text{ cm}^2$ である。代替形態で實質的に多少反応性試験表面が必要になることがあるので、試験片の大きさは上記に限定されない。

#### 任意選択的光学薄膜材料

図1を参照すると、単層光学薄膜の最も単純な説明として、基板を薄い層の材料で被覆し、膜の外面からの反射と基板の外面からの反射が、破壊的干渉によって相互に打ち消すようにする。第1に、反射は $180^\circ$ 度ずれていなければならない。第2に、これらは同一振幅または同一強度でなければならない。

反射モードでは、本発明のデバイスの被覆の光学薄膜特性は、ある波長の光の反射を抑制し、別の波長の光の反射を増強する。これにより、入射光の抑制された波長は、基板または基板上の不透明の被覆に入り、そこで吸収される。反射が抑制されない他の波長の光の多くは被覆された基板には入らず、反射するが、幾つかの成分は吸収される。被覆の光学厚さが変化すると、反射光の波長の範囲が変化する。透過モードでは、被覆の特性は、反射モードの場合と同様に、幾つかの波長の光の反射を抑制し、他の波長の光の反射を増強する。これにより、入射光の抑制された波長は基板に入り、透過する。反射があまり大きく抑制されない他の波長の光は反射し、透過の程度は小さくなる。被覆の光学厚さが変化すると、透過光の波長の範囲が変化する。

目標可能な色信号生成が必要な場合(図6の右側参照)、最終分析結果は計算によって測定することもできる。理想的には、以下で述べる特定の割合割合おおよび光学基板を使用して完全干渉膜を生成するには、基板は、受容体層(以下参照)の屈折率の二乗の屈折率、つまり $(1.5)^2$ つまり $2.25$ を持たなければならない。この数字が異なっても、以下で述べるように、本発明の有用なデバ

イスが得られる。選択される材料は、以後の工程に対し機械的に安定しており、反射し、既知の屈折率でなければならない。光学基板を、例えば生物学的膜など特定の膜に整合させることは、常に可能なわけではない。そのような場合、適切な光学基板の欠如を補償するために、中間光学薄膜を使用しなければならない。目標可能な色信号生成の場合、基板材料は次の2つの制約を受ける。第1に、それは光学薄膜材料に接着しなければならない。第2に、最も単純な例では、基板の屈折率がその直接上の材料の屈折率の二乗にほぼ等しくなければならない。より複雑な試験表面では、基板の屈折率が「光学ハンドブック」のpp8-48ないしpp8-49の表3の式の一つにほぼ当てはまるように選択しなければならない。例えば、約4.1の屈折率を持つシリコン・ウェハを使用すると、試験表面は、広範囲の対応する光学薄膜または反射防止材料を用いて設計することができる。この材料は、調整させる波長の4分の1波長の厚さに、または表3に示す式の近似例の厚さにまで被覆しなければならない。当業者は、様々なその他の材料が、上記基準を満たすならば、試験表面として使用するのに適していることを理解されるよう。

光学薄膜被覆は、既知の被覆技術によって基板の表面に沈積する。例えば、真空チャンバ内でのスパッタリングや蒸着などによって実行する。様々なその他の便利な被覆技術が当業者には周知である。光学薄膜被覆として有用な材料は、利用される厚さでかなり透過的な透明材料から形成され、基板を被覆したときに、ある波長の反射光を抑制する。膜は、いったん光学基板に沈積されると、その後の工程にも安定である。

この試験表面は少数の光学層を有することが望ましいが、以下に述べる変化によって、表3に示す式に対応するより多くの層を有するより複雑な試験表面を設けることもできる。すでに述べた通り、材料選択の出発点は、理論計算である。理論的な考慮点を用いて、どの材料が事前に選択された基板と互換性があるかを決定することができる。被覆の厚さは、予め決められた4分の1波長の厚さに、または事前に選択された干渉色に合わせて設定することができる。しかし、本発

明の特定の割合割合光学薄膜化合物を生成するには、初期被覆に多数の調整が必要である。これらの調整を以下で述べる。

例えば、研削シリコン・ウェハなどの基板は、約4.1の屈折率を持つ。表1の第1方程式に従って、試験表面の効用を最大にするには、選択される光学薄膜材料が2.02(つまり、4.1の二乗平方根)の屈折率を持たなければならない。最大「みかけの」色変化は、シリコンの場合、窒化けい素( $\text{Si}_3\text{N}_4$ )またはけい素/二酸化けい素複合体など、ほぼ2.0の屈折率を持つ材料により達成される。同様の屈折率を持つ他の光学薄膜材料として、酸化チタン、酸化亜鉛、酸化クロム、チタン酸バリウム、酸化カドミウム、酸化マンガン、酸化鉛、酸化亜鉛、酸化ジルコニウム、酸化ニッケル、酸化アルミニウム、窒化ほう素、フッ化マグネシウム、酸化鉄、シリコン・オキシニトリド( $\text{Si}_3\text{O}_4\text{N}_4$ )、酸化ほう素、フッ化リチウム、および酸化チタンなどがある。

#### 窒化けい素

窒化けい素の沈積の1つの方法として、前に $\alpha\text{-Si:H}$ の沈積で述べたのと同様のプラズマ・エンハンス化学蒸着法がある。この技術およびこの技術の変形は、多数の材料の沈積に適用することが認識されている。例えば、 $\text{Si}_3\text{N}_4$ を生成する場合、アンモニア( $\text{NH}_3$ )ガスをシラン・ガスに添加する。窒化けい素は、単結晶シリコンや多結晶シリコンの基板上の光学薄膜として、または光学的に受動的な基板上のアモルファス・シリコンや多結晶シリコン上の光学薄膜として、よく機能する。窒化けい素沈積工程と $\alpha\text{-Si:H}$ 沈積工程との互換性は、非常に費用効率のよい組合せを達成する。2つの膜を次のように沈積することができる。ガラス基板を蒸着システムに取り付け、前に述べたように、厚さ $2000\text{ \AA}$ のアルミニウムの層をガラスに沈積する。次に、基板をプラズマ・エンハンス化学蒸着システムに取り付け、前に述べたように、厚さ $1\text{ ミクロン}$ の $\alpha\text{-Si:H}$ の層を沈積した後、窒化けい素の層を沈積する。この方法により、安価な反射モード試験表面がガラス基板上に形成される。この方法は、1962年12月1

2日にコールマンに発行された米国特許第3,068,510号に記載された誘電体および可塑性基板上の被覆の沈積に延長することができる。窒化けい素の屈折率、または膜性によりけい素/二酸化けい素複合体の屈折率は、蒸着工程で制御することができる。ガスの比率を変化させることができ、あるいは沈積率を変化させることができ、当業者は周知の様々な他の方法を用いて、沈積する光学薄膜の屈折率を制御または選択することができる。

#### 多層膜

多層光学薄膜被覆は、電子ビーム蒸着によって沈積することができる。基板を真空蒸着室に取り付け、蒸着される様々な材料の2つまたはそれ以上の層をつづの上に蒸下させる。次に、各層をつづを電子ビーム銃で加熱し、結晶厚さセンサで蒸着率を監視する。各層をつづは、可動シャッタで覆われている。シャッタを交互に開閉することにより、所望の多層の膜重ねが沈積されるまで、または多重成分膜が沈積されるまで、基板は各蒸着剤に順次露出される。上述の手順は、複数層の様々な光学薄膜材料または特定の屈折率が得られるように特別調整した多重成分膜を沈積するために、3つ以上の層をつづを使用するように普通化することができる。

窒化けい素膜を特定の厚さに被覆した試験表面は、可視光の青緑域の特定の波長を抑制し、したがって黄一金干渉色を反射する。以下の例では黄一金干渉色を用いるが、試験表面の干渉色は、光のスペクトルにおけるどの適切な色にすることができる。色は、選択された基板材料、選択された光学層の化学成分および屈折率、ならびに膜層の厚さおよび数に依存する。これらの設計技術を用いて、光のスペクトルの紫外または赤外線領域の信号または背景を持つ試験表面を生成することができるが、これらの試験表面は、結合分析(bound analyte)の計装検出でしか使用できない。

例えば、フッ化リチウムは、多層膜重ねの1成分を形成することができる。これは可視光に対し1.39の屈折率を持ち、したがって $925\text{ nm}$ の厚さで緑光に

対する4分の1の波長層を形成する。これは、約800℃のプラチナ層のつばから蒸着することができる。

#### チタン膜

チタン膜は、光学膜の形成に特に有用である。こうした膜は、SiH<sub>4</sub>など、他の光学材料より安全に処理され沈着される材料を使用するので、有利である。この適用方法も、必要な装置が少なく済み、費用効果が高く、高速である。

二酸化チタンは可視光に対し約2.2の屈折率を持ち、したがって585Åの厚さで緑光に対して4分の1波長層を形成する。二酸化チタンは加熱するとより低価な酸化チタンに分解するので、蒸着膜は化学量論的(stoichiometric)ではない。化学量論的二酸化チタンを蒸着するには、電子ビームのパルスが発生させなければならない。蒸着は約2000℃で発生する。

有機チタン酸塩は、早期重合やチタン酸塩の凝縮を防止する条件下で加水分解して、二酸化チタン(TiO<sub>2</sub>)とすることができる。後者の反応(早期重合やチタン酸塩の凝縮)は塩基触媒作用である。有機チタン酸塩は、水溶性溶媒システムや界面活性剤と混合することができる。選択された溶媒/界面活性剤システムは高い固体含有量に耐え、すぐれた平滑化または接着能力を持ち、水と相互溶解しなければならない。アルコールや3M(ミネソタ州)によって製造されるフルオロサーファクタントは、この方法に特に有用である。有機チタン酸塩の加水分解は、重合や凝縮の前に発生しなければならない。溶媒システムは、望ましくない重合反応を防止するために酸性でなければならない。酸によって供給される対立イオンは、チタン-酢酸の溶解性を改良するために使用することができ、塩化水素酸が望ましい。非水溶性溶媒システムは使用できるが、有機チタン酸塩が早期加水分解しないようにしなければならない。溶媒は、被覆液の安定性を改良するために、無水物でなければならない。適切な溶媒として、トルエン、ヘプタン、およびヘキサンがある。界面活性剤は(水溶性溶媒システムの場合のように)使用する必要はないが、膜の特性をさらに改善することができる。

これらのプロトコルは、この技術に適用することもできる。光学薄膜を生成するために、ポリメチルシルセスキオキサン(polyethylsilsequioxane)やポリフェニルシルセスキオキサン(polyphenylsilsequioxane)(一般式R<sub>3</sub>SiO<sub>2</sub>)<sub>n</sub>などのT鎖節を光学基板または支持板上にスピニング、炭化けい素の表面に適切な屈折率を得ることができる。

#### 最適化手順

基板、光学薄膜(A膜)、付着層及び受容性材料の特別な組合せのため、最適な背景干渉色を選択するためのモデルが開発された。現在までに開発された数学的モデルは本発明の有用な装置を提供するのに効果的ではないので、これらのモデルは装置調整の開始点としてのみ利用される。最適化は本発明の装置を提供するために必要である。説明目的のためにはあるが、選択される基板はシリコンウェーハとして、選択される最適材料は窒化ケイ素とした。観察される最もコントラストの高い色は、テスト表面上の質量の増加につれてマゼンタに変化するイエローゴールドであった。

図3において、本発明の装置に対する各層の最適の厚みを選択する方法が、シリコン上の窒化ケイ素膜のために開示されている。ステップ1において、シリコン基板が膜面もしくは非膜面のいずれかで設けられる。窒化ケイ素膜はステップ2、3に示すようにこの膜面上に設けられ、加熱及び適切な溶媒内でかき混ぜることにより段階的に侵食される。各ステップのタイミングは最長期間侵食に耐えられる部分が青白く金色を呈するように、他方侵食に耐えられない部分が濃い青色を呈するように選択される。ステップ5、6では各々検出される膜体用の付着層及び受容性材料層が窒化ケイ素上に設けられる。これらの層は経験に基づいて決定されてもよいし、あるいは所望であれば、同様に(例えば、この段階的な方法で)最適化することもできる。ステップ7において、陰性の応答、弱い応答及び強い応答を記録できるように、ストリップの3つの部分が異なる方法で処理される分析評価が実施される。その結果がステップ7に示され、テストにおいて最適な弱

有機チタン酸塩および溶媒システムを混合した後、スピニング技術を用いて、この溶媒の予め決められた量を光学基板に塗布する。有機チタン酸塩を非水溶性溶媒システムと混合する場合は、溶媒を動的選出によって光学基板に塗布する。動的選出は、溶媒をスピニング・コートに取り付け、4000ないし5000rpmで回転させる。溶媒は旋回する基板に塗布され、基板は均等な膜が得られるまで旋回し続ける。水溶性溶媒システムの場合、溶媒の動的または静的選出が可能である。静的選出の場合、溶媒が基板に塗布された後、旋回が開始される。必要な旋回速度は、溶媒の固体含有率(パーセント)、基板に塗布される量、および基板の大きさによって異なる。生成されるチタン層の厚さは、固体含有率、塗布される量、および旋回速度の関数である。

二酸化チタン層は、多くの技術によって基板に硬化することができる。二酸化チタン層の屈折率は、硬化時の基板の温度、およびそれより程度は低い硬化工程の長さによって制御される。硬化工程は炉、赤外線ランプ、ホット・プレート、または電子レンジを使用することができる。

二酸化チタンは、この用途に多数の利点を提供する。

1. 広範囲の光学基板に安価にかつ容易に適用でき、また製造における危険性が無い。
2. 屈折率を制御することができ、1.6から2.2の範囲を調節する。したがって、これを用いることにより2.0の屈折率を持つ置換けい素と同等の材料を得ることができる。
3. 表面に形成されるチタノールは、その後の誘導プロセス(derivatization process)におけるシラノールと同様に化学反応する。

チタン酸塩の他に、けい酸塩、酸化アルキル・アルミニウム、およびジルコニウムの対応する類似物を用いて、この方法によって光学薄膜を生成することができる。

二酸化チタンのスピニング・コーティングの他に、ポリシラザン(polysilazanes)を用いて、スピニング・コーティングによる置換けい素被覆を生成することができる。

い陽性の応答を提供するセクションによって、発明における有用な置換けい素の厚みを決定することができる。

特に、シリコンウェーハを、ウェーハが濃い青に見えるように、窒化ケイ素の厚いコーティング(800Å)で覆った。それから干渉色の光学くさびを作るために、光学薄膜材料を熱い調湿浴の中でウェーハから離してエッチングした。光学材料は、300Åが光学くさびの一端にあり、700Åが光学くさびの他端に接するようにエッチングした。(180℃で窒化ケイ素はおおよそ毎分20Åで除去された。)

エッチングされ、くさびで止められたテスト表面を付着材料で被覆し、その後受容性材料で被覆した。反応性表面を陰性の、弱い陽性の、そして強い陽性の試料で分析した。そして光学材料の厚みを、最も暗かった色変化もしくは視覚的コントラストを提供するように思われる光学くさびセグメントで測定した。最適膜厚は複合テスト表面分析に基づいて最も簡単に選択される。このプロセスは特別な検体のために得られる視覚的コントラストを最大限活用する。

この経験的評価に必要な厚みの光学くさびを作るために、窒化ケイ素は容易にエッチングできる。多くの材料は酸エッチングもしくは塩基エッチングプロセスに影響されやすい。材料をエッチングする他の化学的方法も可能である。膜が簡単に破壊されるので、特別な光学基板から所望の光学膜を容易に取り除けない場合、あるいは光学基板が必要なエッチング液に対して安定しない場合、光学くさびを生じさせる別の方法も使用できる。例えば、単結晶性シリコンは塩基性溶媒に長時間曝されると安定しない。シリコン上の光学膜が塩基性エッチング液を必要とする場合、光学くさびは化学的アプローチを用いて発生させることができない。

いくつかの代替案がある：(1) 光学膜を光学基板上に塗布させ、時間をかけて段階的に被覆チャンバーに導入する。新たに露出される各セクションは露出されたセクションより薄いコーティングを受け入れる。(2) 基板にマスキングを施し、時間をかけて段階的にマスクを取り除く。(3) 各々異なる厚みの光

学材料を作り出す観点からの異なる被覆作業を行ってもよい。(4) 特定の材料をエッチングするためにイオンミリングを使用してもよい。

所定の光学基板及び元の光学薄膜と同じ屈折率の代替光学薄膜のために、この最適化を繰り返す必要はない。上記の方法を使用して、屈折率2.0を持つ窒化ケイ素(Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>)の480-520Å厚が結合分析評価において使用されるシリコンウェハ(光学基板)用に必要であると設定した(実施例2を参照)。同じ付着層と受容性材料を用いて、二酸化チタン(TiO<sub>2</sub>)が屈折率2.0で480-520Åの被覆を必要とすることが示された。屈折率が元の材料のものと正確に同じでない場合、わずかな厚み調節が必要であるかもしれない。

このように、光学薄膜の被覆のために設定される方式が、特定の結合分析評価によわしいテスト表面の製造のためだけのガイドラインとして使用される。予め選択された基板用に、光学薄膜の平方根従属を用いて適切な光学材料を選択する。本発明にとっては、完全な平方根従属からの少しばかりの逸脱は受け入れられる。光学被覆の四分の一の長さの使用は被覆の厚みに対する初期ガイドにすぎない。光学薄膜の厚みはこのように特別な結合材料を考慮して経験的に引き出されなければならない。本発明の特異的な結合結合光学薄膜は該かる膜を製造するために理論上必要な条件を満たしていない。厚み及び屈折率の規則にも従わない。置くべきことに、これらの受け入れられる方式からの該かる逸脱は、質量の変化あるいは厚みの変化に対して非常に敏感なテスト表面を結果的に生じる。

あまり重要ではないが、特別な付着層及び受容性材料層用の最終テスト被覆を最適化するために、光学薄膜層だけでなく各層の相対的厚みを上述したように変更させてもよい。

#### 付着層

本発明は更に光学基板もしくは光学薄膜に特異的な結合層を付着させる層を作り出すための材料及び方法に関する。特に、発明は官能性密度、安定度、及びその層に固定される受容性材料の実行可能性を最適にする付着層を作り出す方法に

関係する。選択される付着材料は生物学的材料もしくは受容性材料と両立しなければならず、(光学薄膜が含まれていようと、なかろうと)上部テスト表面に物理的に粘着もしくは共有的に付着しなければならず、好ましくはテスト表面の所望の薄膜特性を妨げないものでなければならず、また次に続く処理ステップに充分耐え得るものでなければならぬ。

固定される受容性材料(もしくは、ある場合には、酵素)の密度及び安定度は、分析評価テスト表面の性能を最適化するように制御されなければならない。

本発明の有用な装置を得る際の問題点の1つは、他の従来の顕微鏡分析評価材料の幾何学的回折状の表面特徴と比較して、薄膜分析評価に使用されるテスト膜の非常に制限された目標的及び/もしくは幾何学的表面領域であると、出願人は判断した。多くの場合、光学基板は反射的基板の有害な影響から受容性材料を保護する連続付着層で均一に被覆されなければならない。

従来の顕微鏡分析評価では、マイクロタイター井戸等の一般に使用される大きなテスト表面は、薄膜基板に対してより大きな全体表面領域及び幾何学的回折状の表面を持つ。このように、固定される受容性材料の量が、固定化プロセスにより生じる構造上あるいは化学的変化から生じる視野の希薄、あるいは実行可能性(検体を結合する能力)の損失を補償する。更にそれは不十分な配向ゆえに結合のために利用できないかもしれない受容性材料も補償する。こうして、出願人は、直接的な薄膜分析評価において、表面領域の制限は受容性材料の官能性密度、実行可能性、安定度及び入手のしやすさを最大限活用するために計画される特別な材料及び手順の使用もしくは開発を必要とすることを見出した。

特異的な結合分子の保持のためにケイ質材料を応用するための初期作業の多くは、顕微クロマトグラフィーの応用及び使用されるシリカ(SiO<sub>2</sub>)ゲル、及びガラス等の固体支持台に起因する。シリカの結合材料に対する初期活性化は、シクロジメチルシランを用いた処理によって達成された。シランを適用するために使用されるプロセスの如何に関わらず、シラン化は化学的手段によって分子を共有付着させることができる基を導入することができる。

以前は、光学的活性表面は、2箇のメチル基をその表面に付着させるために、シリカ表面で水酸基と結合するシクロジメチルシラン(C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>Si<sub>2</sub>)を使用し、疎水性にされていた。こうして、わずかな疎水性が生じる。出願人は該かる反応は最適な表面反応度を生じないと判断した。図4において、基板上に存在するシリカ基に結合するほかに有用なシラン材料の結合を図式で示している。表面に対する該かるシラン分子の結合だけが、受容性分子との結合用のアミン基等の利用可能な基を提供する。この図から、この方法で結合できる生物学的分子の最大数は、シランとの相互作用に利用できるシリカ基の数に等しいことが明らかである。対象的に、図5に示すように、本発明のはるかに有用な付着分子は基板上に存在する(こうして、より強い結合を提供する)シリカ基に関して多価であるだけでなく、図に示したR基の各々が多価であることができるので、受容性分子に結合でき、また更に所望であれば、シロキサンで結合することもできる基に關しても多価である。当業者であれば、特別なシリコン含有基板もしくは他の基板上で結合され得る受容性分子の量を増加させるために、付着層として使用できる等価シロキサンもしくは他の分子を容易に判断することができるであろう。

出願人は、シリコンが次に行われる付着用の固体支持台もしくは基板としてシリカと置き代わる時、本発明においては従来のシラン化は不適切であることを発見した。シランは表面に付着するためにシラノール残基の存在が必要である。単結晶性シリコンと共に、シラノール密度は固定反応のために望ましい官能基の密度を生じるためには不十分であり、従って、最適の受容性材料でないものがテスト表面に付着されるであろう(図4参照)。シリカ及び多くのガラスは高いシラノール含有量を持ち、あるいは高いシラノール含有量を提供するように容易に処理できる。しかしながら、シリコンも、シリカもしくはガラスでは見られない、生体分子にとって有害もしくは不利益である表面の影響を持ち込む。該かるシラン化プロセスも処分を必要とし、多くの場合、監視及び制御するのが困難で困難である危険な材料を生じさせる。このシラン化プロセスはあるレベルの反応度を提供する一方、多くの応用に必要なレベルの感度を提供しない。それに加えて、

アミン含有シランは多くの独特の困難を導き出す。その1つはアミン官能化シランが水溶性であり、アミン基が改質表面からシランの加水分解を触媒することである。出願人は、重合体で改質されたシラン、例えば、PEG改質シランまたはその当量、本発明の装置において官能的に優れていることを発見した(図5)。

好ましい態様において、付着層は均一の方法でスピンコートもしくはエーゾルスプレーコートされる。様々な中間材料が5Åから500Åの間の厚み(それより多い量も使用できる)で基板に被覆される。該かる層は以下の機能を果たし、以下の特徴を持つ材料で形成することができる: 受容性材料のために好ましい環境を作り、受容性材料が(好ましくは費用効果的な方法によって)危険な官能度で結合されるようにし、光学基板にしっかりと粘着し、均一に被覆され得る。

直接的な目標による放出方法論のために理想的には、表面活性化技術は基板の表面に非常に緻密な均一もしくは等角の膜を導入する一方で、安定性のために表面の共有改質を提供するべきである。共有付着のない強く吸着された等角膜が適切であるかもしれない、例えば、単結晶性シリコン、巨視的に平面で均一の光学ガラス、金属化ガラス及びプラスチック等の適当な基板は、光学層(つまり、SiO<sub>2</sub>, Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, 等)で被覆されていようとなかろうと、共有付着のために利用できる反応基が不足しているが、本発明では有用である。一度塗布されると、付着層は共有もしくは吸着性相互作用により、極めて機械的である特異的な結合層の粘着を支える環境を提供すべきである。この付着層は初期光学基板の有害な影響から特異的な結合層を分離するため、充分な厚みを持っていなければならない。

このテスト表面の製造に使用できるであろう材料の3種類の例について説明する。図5において、非線形分枝重合体シロキサンが基板に対する共有付着の要件を満たすことができ、反応性及び安定性において受容性材料を粘着させるであろう。これらの重合体は典型的に、(ペトラルカシステムによって製造される)アリールケル、カルボキシプロピル、クロロプロピル、エポキシシクロヘキシルエチル、メルカプトプロピル、フェネチル、フェネチルスルホネート、ビニル、

メチル、及びメタクリロキシプロピルを含む、多くの異なる官能性(R)を表面に導入することができる2〜3の分岐点を含む。少しばかりのシラノールでも付着に利用できる。これらの重合体シロキサンは置換ケイ素層が上部表面である時に特に有益である。分岐の末端で官能性を有するT構造のポリジメチルシロキサンはカルボキシ、プロピル、及びビニル基(ペトアルカシステム)を含む。これらの材料の代表的な例が米国特許4,208,506、3,530,159、4,359,258に記載されており、参照のためここに挿入した。

これらのテスト表面の製造において有用性を示す材料の第2群は、一般にスチレン/ポリブタジエンの混合物で構成される共重合体で、華秀の表面活性剤もしくは顔形成ラックスである。これらの調製品は溶媒中では粒子として作用するが、表面で、あるいは乾燥された時に、粒子状の性質を保持してはいない。これらの材料は表面の最終構造に強く粘着するように作られる。Scradyが販売するTC7及びTC3粒子、及びBangs LaboratoriesもしくはRhône-Poulencが販売する表面活性剤(アミドもしくはカルボン酸)は、本出願に特に良く適合する。類似する顔形成ラックスもしくはスチレン/ブタジエン/他の共重合体も使用できる。

この種のテスト表面の製造に有用である別の類の化合物は、デンドリマー、スターポリマー、もしくは自己結立ポリマーである。これらの重合体は一度乾燥させた表面に強く粘着する。これらの材料は周期的な方法で作られ、各層が材料の新しい世代を作り出す。どの材料世代も本出願において使用することができる。(図17に図式的に示す)世代5は最良の反応性を提供することを示している。これらの材料は米国特許44,507,466; 44,588,120; 44,568,737; 44,587,329に記載された材料で作られ、これらの材料で構成される。三元デンドリマーの代表は図17に示したポリアミドアミンである。この図において、Yは二価アミド部分を表す。 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{CH}_2-$ 及びYが反復単位である。末端基は図17に示すようにアミンであってもよいが、次の世代のために樹状枝構造分岐として作用する活性基であれば何であってもよい。他の適当な二価部分はアルキレ

ン、酸化アルキレン、アルキレンアミン等を含み、末端はアミン、カルボキシ、アジリジニル、オキサゾリニル、ハロアルキル、オキシラン、ヒドロキシ、カルボン酸エステル、もしくはイソシアナト基である。

これらの材料の全ては、固体支持台上的膜形成力を改善する有機溶剤に対して安定している。これにより、付着層が剥離しやすく、大量に製造できるスピニング技術により作られるようになる。別の塗布方法はディップコート、スプレーコート、もしくは他のエロゾル技術を含む。硬化プロセス(一般的に熱処理)の体、受容性材料と接触する有機溶剤が限らないので、有機溶剤の使用も可能である。硬化プロセスは光学テスト表面に対する付着層の粘着を向上させ、重合及び凝結プロセスの操作を助ける。これらの材料及びこれらの付着層の正確な製造方法の各々の詳細を下記の実施例5、6、7に示す。

シロキサンは本出願において有益である材料の一般的な例を指している。シロキサンは水溶性ではなく、水性コーティング溶媒もしくは試料と接触しても加水分解しない。分岐構造及び重合体という特徴の故に、重合体構造はシランとして単一の孤立した基を形成する(図4)のではなく、テスト表面上に連続膜(図5)を形成する。シロキサンの高度に交差結合した構造は全体の表面積を増加させる。シロキサン膜の屈折率は制御することができ、あるいはシロキサンの側鎖の中に組み込まれる官能基と共に変化することができ、それによって他の層と相互作用させて適切な干渉膜を作り上げる。

シロキサンは基板を共有改質するが、その後の層間剥離なしに表面に粘着し、機械的動作に対して安定であるその他の材料も有用であるので、これは本質的な特徴ではない。重合体を基板に被覆する方法は半導体製造業者の間で公知である。

必要ではないが、所望の特性を伝える付加的な材料を付着層に付着させてもよい。この層は受容性材料の配向、例えば抗体を配向するためにタンパク質A及びタンパク質Gの使用を改善することができるであろう。他に使用できる材料としては、アビジン・ビオチン、合成タンパク質もしくは組織タンパク質A/タンパク質G断片、あるいはペプチドまたは結合A/Gペプチド等がある。

受容性材料を付着層に付着させるための固定化化学は付着層及び受容性材料両方の特性に基づいて選択される。受容性材料はこの材料に共有結合あるいは受動的に付着することができる。付着層が共有付着のために特に適合される場合、付着層を活性化させるための付加的なステップが必要となろう。様々な活性化及び結合手順を使用することができ、例えば、受容性材料を粘着させるために光活性ビオチンを使用できる。通常、それは受容性材料を付着層に受動的に吸着させるのに充分であり、従って、固定化化学手順の時間と費用を節約する。

#### 受容性材料

受容性材料は特異的な結合対の一部として限定され、次のものを含むが、それらに限定されることはない: 抗原/抗体、酵素/基板、オリゴヌクレオチド/DNA、キレーター/金属、酵素/抑制剤、細胞/受容体、ウイルス/受容体、ホルモン/受容体、DNA/RNA、RNA/RNA、オリゴヌクレオチド/RNA、及び他の化学種に対するこれらの化学種の結合と共に、無機化学種とこれらの化学種の相互作用。

付着層に結合される受容性材料は特に関係のある抗体を結び付ける能力によって特徴付けられる。受容性材料として使用できる種々の材料は、二次的パートナー(と選ばれる試料に関して)選択的に結合するであろう材料の種類によってのみ制限される。受容性材料の全体的な膜に含まれる材料の至極には、毒素、抗体、抗原、ホルモン受容体、寄生虫、細胞、ハプテン、代謝産物、アレルゲン、核酸、信使、自己抗体、血液タンパク質、細胞の残骸、酵素、超微量タンパク質、酵素基板、補酵素、ニューロン伝達子、ウイルス、ウイルス粒子、微生物、タンパク質、多糖類、キレーター、薬剤、及び特異的な結合対の他のメンバーがある。このリストは膜分析評価システムを作るために、付着層に付着することができる多くの異なる材料の種々を含むだけである。関係のある選択された抗体がどのようなものであれ、受容性材料は特に関係のある抗体と結合するように計画される。関係のある抗体を含むマトリックスは、液体、固体、気体、もしくは粘着、

唾液、尿、卵せつ物、組織、骨髄、脳髄液、リン液、血しょう、全血、たん、緩明液、抽出液、精液、腫瘍の分泌液、及び心臓の、胃の、胆臓の、あるいは他の洗浄剤等であってよい。関係のある抗体は抗原、抗体、酵素、DNAの断片、値なわていない遺伝子、RNAの断片、小分子、金属、毒素、環境動因、核酸、細胞質成分、毛または細胞毛の成分、タンパク質、多糖類、薬剤、あるいは表Aに記したような他の材料であってよい。例えば、表Aに記した膜画のための受容性材料は、特に表面膜成分 - タンパク質もしくは脂質、多糖類、核酸あるいは酵素を結合することができる。細胞に対する特異的な抗体は多糖類、酵素、核酸、脂質成分、あるいは細胞に応じた宿主により作られる抗体であってよい。抗体の存在は(細胞性もしくはウイルス性)伝染病、癌もしくは他の代謝障害または状態を指示するかもしれない。抗体の存在は食品中毒もしくは他の有毒毒物を示すものであるかもしれない。抗体は薬剤の適用を指示し、あるいは治療剤のレベルを監視することができる。

この技術を利用できる最も一般的に適用する分析評価プロトコルは免疫分析評価である。下記の受容性材料層の構造のために画された膜画は特に免疫分析評価を重点的に取り上げている。しかしながら、一般的な研究は核酸消息子、酵素/基板、及び他の配位子/受容体分析評価フォーマットに適用される。免疫分析評価のために、抗体は受容性材料として作用してもよい、あるいは関係のある抗体であってよい。受容性材料、例えば抗体は安定した、緻密な反応層をテスト装置の付着層に形成しなければならない。抗原が検出されることになっており、抗体が受容性材料である場合、抗体は関係のある抗原にとって特異的なものでなければならないし; 抗体(受容性材料)はテスト表面に抗原を保持する充分な結合性で抗原(抗体)を結合しなければならない。ある場合には、抗体は受容性材料を単に結合するだけでなく、受容性材料の検出可能な改質を発生させるかもしれない。この相互作用はテスト表面で質量の増加を引き起こすか、あるいはテスト表面上で受容性材料の量の減少を引き起こすことができるであろう。後者の例は、分解性酵素または材料の特異的な固定化基板との相互作用であり、実施例

特表平 7-509565 (16)

13を参照のこと。結合、異種交配、あるいは媒体の受容性材料との相互作用が  
発生する特異なメカニズムは、本説明にとって重要ではないが、最終的な分析評  
価プロトコルにおいて使用される反応条件に制約を与えるかもしれない。

一般に、受容性材料は付着層に受動的に付着され得る。必要であれば、付着層によりテスト表面上に導入される遊離官能基も、受容性材料のテスト表面への共有付着のために使用することができる。受容性材料の付着のために利用できる化学は、当業者に公知である。

受容性材料を付着層に粘着させるために広範囲の技術を使用することができる。テスト表面は、所定期間の間隔格に全体的に浸漬することにより；不連続な配列またはパターンで溶液の塗布により；スプレー、インクジェットまたは他の印刷づけ方法により；あるいは適切な溶剤系からのスピコートにより、受容性材料で被覆することができる。選択される技術は、多数のテスト表面を被覆するために必要な受容性材料の量を最小にし、塗布中に受容性材料の安定性／官能性を維持すべきである。更に技術は非常に均一かつ再生可能な方法で、付着層に受容性材料を塗布または粘着しなければならない。

コーティング溶液の組成は塗布方法及び利用される受容性材料の種類に依存する。スピンコート技術を使用する場合、界面活性剤は光学基質または支持台全体に亘って受容性材料の均一性を向上させることができる。一般に、コーティング溶液は受容性材料の付着層に対する受動的粘着を増進するようなpH、組成、及びイオン強度での緩衝水溶液であろう。選択される正確な条件は開発中の分析評価のために使用される受容性材料の種類に依存するであろう。—幾つ特別な種類の受容性材料、例えば、多クローン性抗体のためにコーティング条件が設定されると、これらの条件は該かる受容性材料に基づく全ての分析評価にとって適切なものとなる。しかしながら、化学的に独特な受容性材料、例えば、多クローン性抗体及び糖鎖は、同じ緩衝液及び塗布条件の下では付着層に均等にうまく被覆しないかもしれない。

受容性材料が抗体である時、付着層が丁銅造のシロキサンである場合、適切な

粘着が得られることが示されてきた。T 構造のシロキサンは抗体の相互作用のために非常に均一な親水性表面を提供する。実施例 6 を参照のこと。

書くべきことに、膜形成ラテックスは一般にシロキサンよりも、抗原に対するはるかに良好な付着を提供する。固体化抗原との抗体の相互作用はシロキサン改質表面上で改善される一方、基質との疎水反応はシロキサン改質表面に対して、ラテックス改質表面上で改善される。

上記の材料及び方法は特異的な結合テスト表面の構築を可能にする。テスト表面は光学基板または支持台、任意の光学薄膜、付着層、及び最後に受容性材料層で構成される。特異的な結合発生または相互作用の視覚的測定のため、複合干渉膜が光学薄膜、付着層及び受容性材料を含むように実際上設計される。付着層及び受容性材料が光学薄膜に被覆される時、選択される初期干渉色が維持されなければならない。図3を参照のこと。一度表面が受容性材料で被覆されると、領域のある液体を含む顕微鏡の小さなスポットが表面に塗布される。これは数分間培養され、すいでは、室温流の下で乾燥される。これは分析評価される試料が陽性であろうと陰性であろうと、展開される手順管理を発生させる。この管理によりエンドユーザーに対して、正確に分析評価プロトコルに従い、キャット内の全ての試薬が正しく作用していることが保証される。手順管理はあらゆる所望のパターンにおいて適用できる。

手廻管理と同様に、受容性材料をパターンに適用することができる。このように、装置は光学厚膜が光学基板に塗布された時に、多色光に応じて目標により検出可能な記号を提供する。受容性材料を含むコーティング溶液はマスクで覆われた表面に塗布されてよい。マスクはコーティング溶液に露せられている部分においてのみ、受容性材料が付着層に固定化されるようにする。受容性材料で均一に被覆された表面をマスクで覆い、受容性材料を選択的に不活性化することができる。受容性材料の不活性化によって適切な多くの技術がある。生物学的材料にとって最も簡単な技術の1つは、その材料を不活性化するために生化学的時間の間、受容性材料の部分を紫外線放射に晒すことである。マスクは結果の解釈においてエン

ドユーザーを助けるであろうパターンならどのようなパターンにも設計できる。

受容性材料のパターンを発生させるために、押印、インクジェット印刷、細管被ディスペンサー、及び他の微細加工装置等の技術が適切である。受容性材料はこれらの技術によってパターンに塗布され、所定期間培養される。その後表面からすくわれる。付着材料の露出部分は受容性材料に類似する不溶性材料で被覆することができると。

干渉色の特に有益な組合せは、テスト表面背景もしくは開始点のための黄色／金色の干渉色を弱くする。一度質量の増加が表面で発生すると、質量は厚み及び濃度の直接的な関数であるが、反応領域は干渉色を紫／青色に変化させる。上述したように、生物学的テスト表面の調製において必要な層を被覆し、所望の開始干渉色を維持するために、光学厚積の調整・最適化を行うことが可能。

### 質量の増大

特異的な結合対の直接的判定を行う陽離検出方法は、蛍光、発光、及び熱量の測定等による検出計画、もしくは他のタグ位検出計画を含む、放射能もしくは誘電的手段に関して重大な利点を提供する。陽離システムは小分子の検出に応用できる。しかしながら、該様な検体は感度目標による、あるいは誘電率による検出に対して充分な厚みもしくは光学の密度を作り出せない。出願人は、質量増大のための手段が必要であることを発見した。しかしながら、陽離検出システムは該の完全性が維持される時、最適に作用する。このように、該様なシステムにおける拡大のための方法は、検出システムにより課される制約条件を満たす、最も簡単な可能性のある構造であるべきであると共に、厚みもしくは質量の増加を提供し、該の完全性を維持するべきである。

C. Fredrik Mendenhires及びE. Kosbach, 170 Anal. Bloch, 58, 1988は糖質優先性の分析評価において、コンカナバリンAもしくは $\alpha$ -G抗体で被覆された微小シリカ粒子を用いる方法を説明している。シリカ粒子は濃度依存方法で生物層の見掛け厚みを増すような、生物層に充分近い屈折率を提供する。これらの粒子は性質上硬質であるが、膜の完全性を維持しない。従って、光散乱が発生する。

拡大系は関係のある検体の温度に直接関係してもよいし、あるいは抗拉的もしくは屈曲分析評価フォーマットにおけるように、関係のある検体の温度に反比例してもよい。質量増大もしくは拡大試薬の結合は、テスト表面に対する検体結合の特異的な関数であり、信号発生試薬の一部として考慮してもよい。

図7において、本発明の装置上の機体の存在を信号増幅により検出できる2つの方法を図式的に示している。例えば、受容性材料セラックス粒子で分類された機体に接触させることにより、あるいはその2つを結合させると、受容体機体層の厚みを増大させる位の手段により、信号を増幅することができよう。あるいはその代わりに、機体は二次的結合剤を通して際まで分類されてもよく、その場合、その膜素に対する基板の厚さによって受容体-機体-膜素の組合せが検出されないかもしれないが、テスト装置の上に製品を置き、目視で検出できる。出願人は、基板から製品の配置を促進するように装置表面が帯電されることを保証することが有利であることを発見した。

質量増大試薬は二次的受容性材料に受動的もしくは共有付着ができなければならない。質量増大試薬に対する受動的付着の例は、表面活性剤位子上への抗体の吸着である。質量増大試薬の二次的受容性材料に対する共有付着の例は、抗体に対するセリコワフサビ・ペルオキシダーゼ(HRP、または別の酵素)の吸着である。使用するメカニズムに関わりなく、質量増大試薬は二次的受容性材料と共に安定した製品までもは付加物を形成すべきである。選択される結合プロトコールは非特異的な結合効果をテスト材料に懸すべきではない、導入すべきでもない。質量増大試薬は更に抗体との直接的かつ特異的な相互作用が期待できる。



このように、発明は薄膜検出方法に依存する分析評価システムにおいて、信号増幅のための方法と特徴とする。該かる方法には、標的偏光法、干渉効果、プロファイルトリー、定重トンネル型微鏡法、原子力顕微鏡法、インターフェロメトリー、光散乱、全反射、もしくは反射率計技術等があるが、それらに制限されない。これらのタイプのシステムにおける使用のために選択される材料は、好ましくは溶液中である程度の粒子状特性を維持し、表面もしくは支持台と接触すると同時に安定した薄膜を形成する。膜は基板の所望の薄らかさまたは厚さを維持するために、好ましくはナスト表面に対して等角である。表面組織の特徴は使用する検出方法に依存する。選択される材料も共有または受動的相互作用を通して、受容性材料または特異的な結合対の一部を粘着させることができなければならない。二次的受容性材料もしくは結合試薬は、その二次的受容性材料の反応性及び安定性を保持する方法で、信号増幅材料または粒子に粘着されることが好ましい。粒子に塗布される二次的受容性材料は、テスト表面に固定化される受容性材料と同じであってもよいし、あるいは適合するものであってもよい。二次的受容性材料または結合試薬と付加的材料との組合せは、粒子、酵素等であって、質量増大または信号発生試薬を形成する。

一般に、増幅を必要とする光学分析評価は、その特性及び特徴が使用される検出方法のタイプにより決定される基板、光学的二次光学材料、付着層、受容性材料層、及び質量増大試薬で構成される。一般的な分析評価プロトコールは、関係のある検体を含むと考えられる試料が、細胞質抗原の抽出等の必要な処理を通して処理され、その後二次的試薬または増幅試薬と混合されることを求める。この混合物のアリコートは受容性材料被覆基板に塗布される。適当な培養期間の後、物理的すすぎ/乾燥プロトコールにより、あるいはすすぎ/乾燥ステップを含む装置で、未結合の材料が反応膜から分離される。その後目視または器具により信号を判断する。二次的試薬もしくは増幅試薬の導入は、試料試薬もしくは塗布装置において逐次乾燥された材料、または分析評価装置に増え込まれた材料として、試料に対する試薬の添加により達成される。

る化学、反応種の性質、及び粒子の組成により影響される。温度に加えて、培養期間の長さ、固定化化学、膜形成組成（pH及びイオン強度）、及び二次的反応材料の量が特定の応用のために最適化されなければならない。

下記に示す特殊な例（14、15）は膜形成試薬の製造に使用される方法のタイプを示すためのものである。記載された条件は該かる試薬の製造に制限を加えるためのものではない。スチレン/ブタジエン/ビニル共重合体は好ましい膜形成ラテックスの組成である。しかしながら、膜形成特性を維持する如何なるスチレン/ブタジエン共重合体も使用できる。官能基は二次的結合試薬の粘着または相互作用を支持するであろう化学組成のものであればよく、二次的結合試薬は関係のある検体と本質的に結合するであろう。Soradynが販売するTC7及びTC3の混合物、及びBangs LaboratoriesまたはRhône-Poulencが販売する表面活性剤混合物が好ましい（そのカタログを参照のため挿入する）。従来のラテックス粒子（S/B/V-COH、S/B/V-COOR、S/V-COHR、S/R-NH<sub>2</sub>、S/BYDRAZINE、S/R-COOH、S/B-COOH、S/B-COHR<sub>2</sub>、PS、S/VBC、S/A/B-COOR、PYMA-COOR、S/A-OH、S/R-OH、及びS/R-SBと称する）は本発明においてある種の有用性を表示したが、膜形成ラテックスより散漫な信号を作り出す傾向がある。

#### 固体の修飾製造

出願人は、薄膜表面に不溶性の析出生成物を作る酵素/基板の対によって、より感度の高い光学薄膜分析評価を得ることができることを見出した。この試薬技術の感度は該方法の感度を改善する。本発明において有用な酵素は、グルコースオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ等である。しかしながら、受容性材料に付着される特殊な成分を提供し、析出生成物への基板の転化を触媒することができるプロセスであれば、何でもこの技術にとって適当である。テスト表面に固定化された抗体-抗原-抗体-HRPの対は存在する時、不溶性の反応生成物が生じる。生成物はアルゲン酸、硫酸チオキストラン、メチルビニルエーテル/無水マレイン酸共重合体、もしくはカラゲニン等と、

#### 重合体固性

本発明において有用な重合体は等角（膜形成）であり、特別な特徴を表面に持ち込まない。広範囲のスチレン-ブタジエン共重合体は膜形成分析評価、免疫分析評価、及びクロマトグラフィーの応用において利用である。一般に使用されるラテックスは高度に交差結合された、硬質の共重合体である。これらの応用におけるラテックス粒子の最も一般的な使用法は、所望の検体の検出及び分離のための固体支持台としてである。低い交差結合によるスチレン-ブタジエン共重合体は表面活性剤または膜形成ラテックス粒子と指定されている。これらの製品は溶液の中では粒子としてふるまうが、表面と接触すると等角に対して乾燥状態になる。これらの膜形成スチレン-ブタジエン共重合体は広範囲に亘る官能基結合高を含むことができる。

更に、硬質のポリスチレン粒子も染料の添加による信号発生のために使用されてきた。これらの粒子は信号発生のためのタグまたはラベルの導入のための代替方法にすぎない。膜形成分析評価及びメンブレンを基礎とする分析評価用の染色または染色されたラテックスの使用は、広く利用されてきた（再検出のために、L. B. Bangs, American Clinical Laboratory News, May 1990を参照）。前者の場合、これらの粒子のための主要な要件は、膜形成分析評価において検出のためにそれらの構造を維持し、メンブレンを基礎とするテストの細孔を遮断するようにゆがまないことである。共有付着が特定の相互作用する化学種に特別な利点を提供する一方、ラテックスに対する受容性材料の受動的吸着が適切であることがしばしばある。

適当な膜形成ラテックス粒子の製造においては、所望される検体の見掛け厚みまたは密度を増すために、膜形成粒子、もしくは二次的反応種と同等し充分な大きさを有する表面活性剤の選択が必要である。

二次的反応種は所定時間、適切な温度での培養により、表面活性剤粒子上に固定化できる。選択される温度は二次的反応種を粒子に付着させるために利用され

TMB（3、3'、5、5'-テトラメチルベンジジン）と酸素遊離基との相互作用により形成される生成物との組合せ等の析出剤の作用によって析出される。この特別な基板は遊離基がTMBと接触する時はいつでも不溶性の生成物を形成する。他にクロロナフトール、ジアミノベンジジン、チトラ塩酸塩、アミノエチルカルバゾール、オルトフェニレンジアミン等の物質も使用できる。これらは約10〜100mMの濃度で使用される。質量の固定可能な増加は酵素共役層と共に発生する。色信号は基板溶液中に存在する発色団の基本色による影響を受けない。表面に析出される質量を増加させる種々の酵素基基または検出系が使用できる。

膜形成や連続検出等、人における細胞感度に対して一般的に責任のある細胞群から引き出された多量抗原の低レベルの検出のために、膜形成分析評価における酵素により分類されたこのような検体方法の例を実施例16、17、18に示す。

図6において、その上部表面に種々な層が被覆された基板を持つ多層膜の横断面を表すグラフが示されている。1例では、これらの層は上部光学基板層に直接隣接する置換ケイ素の層、重合体シロキサン等の付着層、及び細胞抗原分析評価に対する抗体である受容性材料を含む。図7において、検体が存在する場合、酵素により分類された抗体及び検体を持つ検体がテスト表面に同時に形成される。前述の生成物析出物形成させるために基板が入れられるのはこの膜の上である。

所望であれば、関係のある検体は同時または連続添加プロセスのいずれかにおいて、質量増大試薬及び固定化された受容性材料と組み合わせてもよい。いずれのメカニズムもテスト表面に固定化される検体/質量増大試薬の形成を生じる。このように、質量増大試薬は試料と直接混合されてもよい。この混合物は次に反応性テスト表面に塗布され、必要な期間培養される。これは同時分析評価フォーマットである。

ある場合には、付加的な感度は試料の連続添加を行い、続いて質量増大試薬を添加することにより得られる。如何なるメカニズムあるいは特異的な相互作用も、質量増大試薬の発生のため利用できる。例えば、被覆は金属等の多数の材料及び

ある種の染料をしっかりと結合する、あるいは挿入することが知られている。これらの材料は特別に固定化される核酸に質量を導入する働きをするであろう。

生成物層の増加は視覚的手段、もしくは精確な分光等の器具の使用や光強度差が増加した塚山により生じている場所等により判定することができる。受容性材料要素自体はこのように、関係のある液体との直接的相互作用が可能であり、より詳細には、抗原等の液体の証拠である。この変化は光学取手を測定することにより検出でき、必ずしも高反射材料の光反射力に依存しない。該かる器具の1つは、米国特許4,332,478、4,655,595、4,647,207、4,558,012に記載されているSegar Ellipsometerであり、その開示を完全に挿入し、この明細書の一部とする。

#### 装置

装置フォーマットにおいて上記の多層テスト表面の幾つかの配列が可能である。最も簡単な分析評価フォーマットは単一使用、単一試料装置である。より複雑な装置は1つの試料が多数の液体の存在のために審査されるようにする。付加的な装置は多数の試料を1つの液体またはバッチテストのために審査できるようにする。

単一使用装置は、感染症テスト、抗原または多量反応等の広範囲の分析評価に適合可能なフォーマットを使用しやすくする。これらの単一テスト装置を使用するためのプロトコルは非常に簡単である。密封された装置が開けられ、反応性テスト表面を露出させる。試料がテスト表面に塗布され、短時間の間、例えば2分間培養される。試料は例えば細菌からの抗原抽出等の前処理を必要としても、なくてもよい。テスト表面への塗布の前に試料に二次的抗菌を添加することが必要であってもよい。培養期間が完了すると、無反応の試料が水ですすぐことにより除去される。装置はテスト表面を乾燥させるために扱い取られる。使用されるテスト及び質量増大/拡大方法に応じて、分析評価が完了し、あるいは分析評価は付加的な培養/洗浄/乾燥サイクルを必要とするかもしれない。テスト装置及びプロトコルは医師の事務所、臨床研究室、家庭またはフィールドテスト用

環境にうまく適合する。装置のまわりに、例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン等、成形装置または射出成形装置に容易に形成される材料で構成される保護シェルが設けられることが好ましい。多液体もしくは多試料装置は同様のプロセスを用いて、同様の材料で作ることができる。

#### 単一使用装置

該かる装置の特定の例を図に示す。

例えば、一般的に図8A-8Gにおいて、単一使用装置は如何なる大きさの成形装置にも納められるが、この例では、装置を開じた時の大きさは長さ1.74インチ、幅2.23インチ、高さ0.375インチである。装置はテスト表面を保持する基部と、洗浄液と余分な試料を保持するための吸収性パッドで構成される。装置の蓋はテスト表面から過度の湿気を取り除くブロッカーパッドを保持するように設計される。装置の基部にある吸収性パッドあるいは蓋の中のブロッカーを固定するため、プラスチックの薄片がリビングヒンジによって装置の各部に付けられる。装置の基部と蓋はリビングヒンジによってつながれる。しかしながら、多数の開閉サイクルを可能にする如何なる留め金または鎖等の組合せも使用できる。吸収性パッド及びブロッカーを装置の中に置き、これらのカバーを閉じて材料をしっかりと縛める。これらのプラスチックカバーは、吸収性材料の中に含まれる洗浄液及び余分な試料の露出を防止することにより、エンドユーザーに対する保護を提供する。装置の蓋は留め金が付いていても付いていなくてもよいが、密封シールがあることが好ましい。装置は容易に配位され、あるいは貯蔵のために便利な大きさであるべきである。装置の全ての構成要素は、反応性テスト表面を除き、必要であれば殺菌できる。

上部ブロッカーパッドには幾つかの独特の要件がある。複合ブロッカー材料はテスト表面の真上に装置の蓋の中に設置されなければならない。蓋が閉じられ、ずがれたテスト表面がブロッカーパッドと接触すると、テスト表面はブロッカーパッドに充分圧縮され、テスト表面から溶液を幾度にも選択的に扱い取られな

なければならない。ブロッカーパッドは、付加的な洗浄/乾燥ステップのために、新鮮な乾燥材料がテスト表面に供給されるように、小さなプラスチックスライドの上に取り付けることができる。ブロッカーの初期材料は表面から水を幾度にも急速に扱い取るように、つまり底が高い吸収率を持つように選択される一方、次の材料は高い吸収能力を持ち、テスト表面から水平に溶液を取り除く。表面の潤滑のブロッカー材料は光学テスト表面を流してはならないし、こすってもいけない。Photoanのグレード1Chaperonはこの機能を非常にうまく果たすが、代わりの材料でもよい。高度に吸収性のある材料がブロッカーパッドの付加層として使用される。2つの付加パッドがグレード1Chaperonとの組合せで、2段階乾燥プロセスにとって最適であることが見出された。層は遊離していても、共に積層されていてもよい。多数のすすぎ/乾燥が必要な場合、ブロッッキング材料を支持するスライドがテスト表面の上に新しいブロッカーを置くためのハンドルを持つ。このハンドルは、ブロッカーがテスト表面と接触する時に、移動するのを防止するため、装置の基部の上の保護シールドの中の開口部に収められる。

反応性テスト表面は装置の基部の上に伸びるピラミッド型の支持台の上に取り付けられる。すすぎ溶液はテスト表面の上を流れ、支持台の表面を下り、吸収性パッドに捕らえられる。更に、支持台は蓋が閉じられた時に、テスト表面がブロッッキング材料の中に圧縮されるように、テスト表面を配置する。支持台の上に取り付けられるテスト表面は0.5cm<sup>2</sup>〜1.0cm<sup>2</sup>の大きさであり、好ましくは0.75cm<sup>2</sup>である。目視分析評価のためのテスト表面の大きさに関する唯一の制限は、無反応のテスト表面が反応領域と対照して目に見えることである。干渉色変化もしくは陽性の応答に対して生み出される他の信号は永久的であるので、テスト装置を密封し、永久記録として保存することができる。

図8A-8Gにおいて、本発明の単一使用装置を示す。特に、装置20は容易に成形可能な硬質プラスチック材(クリップ22付き)で形成され、装置内にあるテスト表面に対する損傷を防止し、装置の構成要素の適切な配置を確実にする。テスト表面が(図8Fに示すように)腔の内部構成要素に対して浮揚するように、

装置の下部表面がくぼみ24にくぼませられ、そこでテスト表面26がピラミッド状構造物28の上に載せられる。縁の同かい合ったクリップ22の上に番号30が設けられ、装置の上半分32を下半分34に対して上下できるようにする。

特に図8Eにおいて、テスト表面26は前述のようにピラミッド28の上に載せられて、装置の下半分34に設けられ、表面26の上に置かれた液体が表面からピラミッド28の下へと流れ、回りの壁38と同じ高さで配置される上表面を持つプレート36の下の囲まれた領域に流れ込む。プレート36は下半分34の1方の側42に番号40によって取り付けられる。

装置の上半分32には、1方の縁50に付いた上半分32に番号48によって取り付けられる第2のプレート46が設けられる。2つのアパーチャ47と48がプレート46の中に設けられる。プレート46の下には、矢印58で示すように、アパーチャ48(1)の右半側の位置からそのアパーチャ内の左半位置(11)へと移動させることができるハンドル56を備えた可動プレートにあって遮断紙52がある。このような動きは遮断紙52の移動を引き起こす。

次に図8Gにおいて、プレート36及び46はそれぞれ番号40と44のまわりの回転により、図8Eに示した位置から取り除くことができる。プレート36の下には、ピラミッド28から流れる液体を吸収するための厚いフィルターパッド(吸収材)60がある。アパーチャ62はプレート36の中に設けられ、プレート36がピラミッド28の上に当てはめられるようにする。プレート46の下には、遮断紙52、54及び64が設けられる。遮断紙52、54、64は前述のように図8Eにおける位置1から11へと、ハンドル56の動きにより番号48に対して左から右へと動かされる。アパーチャ42、44はプレート36の中に設けられ、位置1と位置11にある時、ハンドル56と協働し、装置10が装置の使用で閉じられるようにする。特に、遮断紙52の露出度は、装置が閉じられている時、遮断紙52の表面がテスト装置26の表面と接触し、その表面上の液体を吸収するような程度である。ハンドル56(及び装置されたプレート66)の動きは、装置を再度閉じた時に、遮断紙52の新しい部分がテスト表面26と

接触できるようにする。

この装置は標準の手順を用いて製造できる。特に、一度プラスチック枠が形成されると、濾過紙52、54、64は装置の上部部分内に置かれ、プレート46がこれらの紙の上に固定されて、上部部分32内にこれらの紙を保持する。同様に、プレート38を固定することにより、濾過紙60を下部部分34内に固定することができる。再プレート38、46には、これらのプレートを適所に保持するために、各々リップ部分68、70と係合するように適合される（図示しない）溝に沿って、複数の小さな突起出しが設けられる。更に、上部部分32内に溝72が設けられ、プレート46がその溝の上に載せられ、内部空間74の中で濾過紙52、54、64が動けるようにする。テスト表面28は接着剤または他の手段により、ピラミッド28に容易に取り付けられる。

#### 使用法

図10において、本発明の方法において装置20を使用できる方法が示されている。特に、ステップ1において、試料が適切な方法で得られ、処理されて、テスト表面への塗布のために準備される。このような塗布は装置を開いて行われる。ステップ2において、試料は、試料に存在する液体が受容体層と反応できるように培養される。ステップ3において、試料はテスト表面が洗浄され、余分な液体はテスト装置を保持するピラミッドの下部のフィルターの中へ流される。この段階で、上部フィルター材料の位置は1である。ステップ4において装置は閉じられ、フィルターがテスト表面を吸い取るように締められる。ステップ5において、適切な蓋板が加えられ、培養されて、再び上述のようにすすがれる。この時点で、上部フィルター材は位置1から位置11へと動かされ、装置は再び開かれて、テスト表面が乾燥される。この時点で、装置は再び開かれ、結果が読み取られる。

#### 多重テスト装置

一般的に図9A-9E及び11において、多検体用に1つの試料を調べる装置

うして反応性テスト片は必要な如何なるサイズであってもよい。均一に設置されたテスト表面は標準のマイクロタイター井戸フォーマットが設計される充分な大きさであることができる。井戸は相互汚染の無い試料塗布のために貯水層を提供し、現在のEIA分析評価自動化技術を開拓する。テスト装置は、予め設定されたx、y座標に受容性材料が配置される、如何なる大きさでもよい、標準なプレートであってもよく、試料の塗布がこれらの座標から離れて行われる。試料間の相互汚染は、反応領域を囲む疎水性井戸、他のタイプの物理的障壁、あるいはマイクロスポットサンプリング技術によって制御できるであろう。これらのタイプの多試料・単検体テスト装置は、半自動化もしくは完全に自動化された器具使用に適合されるであろう。図12を参照。パッチテスト用には、目視による判断より器具を使用しての判断が助められる。パッチテスト表面はブロッカーデザイン、ヒートランプまたは他のこのような装置を用いて乾燥させてもよいし、あるいは強制空気を乾燥方法を用意してもよい。試料の乾燥及び汚染されたすすが液は貯水層に排水し、そこで処分される前に処理することができるであろう。あるいは、余分な試料とすすが液をテスト装置の密封されたセクションに引っ張ることもできるであろう。

パッチもしくは多試料装置は定性、半定量、もしくは定量テストフォーマットで設計することができる。パッチテスト表面は如何なるサイズであってもよい。サイズは単一分析評価で行われるべきコントロール及び試料の数によって決定される。自動化試料処理装置及び試料塗布装置がテスト表面のサイズに強い影響を与える。自動化試料処理及びパッチテストの応用には、血液銀行用の血液審査と共に医療及び関連研究所のものが含まれる。これらの研究所は大量かつ限度のテストメニュー：大量かつ大きなテストメニュー：あるいは少量かつ大きなテストメニューを必要とするかもしれない。テスト表面デザイン上の柔軟性はこれらの要件全てが単一光学検出方法で満たされることを可能にする。試料の量もしくは其塗布されるテスト数を増加させるために、付加的な試料処理及びテスト設置操作が必要とされるかもしれない。

は単一使用装置の特徴の多くを具備している。装置の最初の位置は多くのテスト表面を露出させ、各々が異なる受容性材料で均一に被覆される。装置はエンドユーザーを助けるために、上部表面上に印刷されるテストプロトコルを有する。装置にはテスト表面が脱つても取り付けられるが、5つの独立した分析評価が非常に簡単に行われる。試料はテスト表面の各々に塗布され、培養される。培養期間の後、テスト表面は水ですすがれる。テスト表面はすすが液と余分な試料を装置の下部にある吸収性パッドに排水する傾斜した凹地の上に取り付けられる。蓋が持ち上げられて、第2の位置に進められる。これはブロッカーパッドを各テスト表面と接触させ、単一使用装置において説明したように、それらを乾燥させる。蓋が持ち上げられ、テスト表面が再び露出される。単一使用装置の場合と同様に、テストはこの時点で結果が読まれてもよく、あるいは付加的な培養/すすが液/乾燥サイクルを必要としてもよい。装置は必要な多数のステップを収容するために容易に延長することができる。このタイプの装置は製品の運用、アレルギー審査、伝染病審査、性的伝染病、TORCHパネル等のために患者を調べる際に特に有用であろう。テストプロトコルはかなり簡単であり、医師の事務所、医療研究所及び関連研究所のテストに適しているであろう。フィールド使用は、最もしくは全血が被審査試料である場合に可能であろう。この例のために、各反応性テスト表面が受容性材料で均一に被覆された別個の0.75 cm<sup>2</sup>のテスト片として装置内に表示される。各受容性材料をテスト片の表面を横切る不連続な線またはスポットで塗布することが可能である。そうすればテスト装置は単一使用装置のサイズに近づくであろう。

更に、単一使用装置に非常に近い多数の検出を持つ装置を設計することも可能である。この場合、リビングヒンジで留められた蓋は検出の上に取り付けられた各テスト表面の上に正確に位置付けられる特定の入口を含むであろう。洗浄液と余分な試料は各検出を囲む吸収性パッドの中に集められるか、あるいは多孔質の固体検出を通り下に置かれた貯水層に流れることができる。

光学基板もしくは支持台は所望の如何なるサイズにも切断することができ、こ

特に、図9A-9Eにおいて、本発明の多テスト装置が図式で表示されている。この特殊な例は、大腸菌、連鎖球菌B、連鎖球菌肺炎、H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>インフルエンザ、N<sub>1</sub>伝染性の存在を突き止めるためのテスト用に設計された。一般に、この装置は複数のテスト装置、つまり5個のテスト装置、100、102、104、106、及び108で構成される。装置は上部の移動可能なカバー110、及びワイヤーループ116を使用してセクション112から取り外し可能な、大きな分厚いフィルター材料114を含む下部の開口部分112を有する。上部カバーには5個のオーバーチャが連続したものが3個、120、122、124と、大きな方形のオーバーチャ126が設けられる。その下面には、フィルター材料で作られる2つの吸収性スポンジ128と130が設けられ、カバー110の下部表面に接着剤で固定される。146、148、150で示すような一般的な傾斜をカバー表面に設けてもよい。

更に、カバー110の内部表面からおよそ4mm伸びる、132、134、136、138、140、142で分類される、3個ずつ連続した円筒形伸張部分が設けられる。上部カバーの各列のオーバーチャがテスト装置の上に、あるいは必要に応じて、下部部分112にある他の傾斜の上に特別に配置できるように、円筒形伸張部分は部分112の下部部分に設けられた空間152と係合するように適合される。この動きは図9Bにおいて一般的に矢印154と156で示される。

下部部分112には更に、テスト表面100、102、104、106及び108上の余分な液体が部分112内に排水され、フィルター114によって吸収されるように配置されるオーバーチャ158が設けられる。下部部分112には更に、160で示される一通の溝が設けられ、それらは移動可能な部分164に沿った空間152に対する、円筒形の伸張部分132、134、136、138、140及び142の係合により係合されるような段階的な方法でカバー110が移動するにつれて順に現れ、装置のユーザーが発明の分析評価を実施するためにどのようなステップが必要であるかの指示を得られるようにする。上部及び下部部分は、濾過紙128、130を分析評価手順において適切な時に、各テスト表

度と接触させるように構成される。

図11において、図9に示した多分析装置の使用法を図式で示している（上部部分下部部分の伸張部分は特に示していない）。ステップ1では、試料が置かれ、適切な位置がそれに適合される。試料は各テスト装置に配布され、装置はテスト表面が試料から空気に置かれるように1割り動かされる（つまり、1つの円筒形伸張部分が矢印156に沿って次の空間152に動かされる）。ステップ2において、第1のフィルター材料130がテスト表面と接触するように、表面が再び動かされる。このステップの前に、テスト表面が洗浄され、洗浄液はアパーチャ158を通りフィルター114に排水されるようになる。ブロッキングの後、装置は再び1割り動かされ、テスト表面へのアクセスを可能にし、基板が配布される。もう一度、適切な培養期間の後、これらの表面は洗い流され、洗浄液はフィルター114に排水される。次に、上部表面が1割り動かされ、フィルター128がテスト表面と接触する。2つの表面がお互いに対してもう一度移動すると、結果の判別が可能になる。プロセスの各ステップにおいて、アパーチャ126はユーザーが取るべきステップを指示し、こうして装置の誤った使用を防止する。

図12は本発明において有用な3つのパッチサンプリングコンセプトを図式で示している。第1の装置（図12の上部）は前述したように標準された、光学的に活性な検体反応性テスト表面#1を含む。テスト表面#1は細々の試料井戸#3を作り出すプラスチック装置#2に接触結合されるか、固付けされる。最終的な装置は96の井戸マイクロタイタープレートと全く同じ方法で形成され処理される。このテスト表面#1の配置は如何なる市販のマイクロタイターに基づく処理システムにも容易に適合される。

パッチテスト用の第2の装置は単一使用装置に非常に類似した装置であり、クックパネル等分析評価（図12の中間を参照）において特に有用であろう。装置は標準#7によって底部容器#5に標準式に取り付けられる重#1を含むように形成される。底部容器#5は余分な試料と洗浄液を吸収するための吸収材#6

れた光は楕円形に偏光された光として、基準表面#3から反射される。次に光はテスト表面（#4）に衝突し、位置#5にある第2の偏光子に反射される。テスト表面（#4）と光の相互作用は楕円形に偏光された光のs-及びp-成分を逆転させる。位置#2と#5における偏光子は同相し、#5は#2に対して90°回転される。基準表面#3から反射されたものと同相するテスト表面#4から反射された光は、偏光子#5を通過し、検出器（#6）において完全に消される。表面#4と#3の表面特性に何等かの差があれば、残りの楕円率が強度の増加を生じさせ、検出器#6で測定されるであろう。

偏度及び偏特性の変化の分析に有用である試かる器具は、米国特許4,332,476、4,655,595、及び4,647,207に記載されたComparison Ellipsometer（比較楕円偏光計）である。試かる器具の光路は前述のように、図13に示されている。この器具は表面を横切る厚みの光学くさびを含む基準表面を使用することができる。厚みの偏が光学くさび上に釣りつけられると、テスト表面の厚みは光学くさびに対して決定される。テスト表面の厚みは光が検出器において消される点における光学くさびの厚みに等しい。

器具は直線偏光多色光の反射により生じる楕円形の偏光度を2つの表面間で比較することに基いて操作される。入射多色光はコリメートされ、直線偏光される。偏光された光は、テスト片のものと同様の、または全く同じ光学特性を持つ反射基板である、基準表面から斜角で反射される。反射光は次に反射の結果、楕円形に偏光される。楕円形に偏光された光はその後テスト表面から反射される。テスト表面及び基準表面はお互いに対して垂直に配置され、テスト表面からの反射の後、光が再び直線偏光され、そこでテスト表面と基準表面が光学的に同一になる。それらの厚み、及び／もしくは屈折率が同一でなければ、その光はある種の楕円形の性質を保持している。楕円率は屈折率及び厚みの差の関数である。次に第2の偏光子を使用して光を通過し、同一偏に対応する直線偏光された光を取り除く。楕円率の増加は第2の偏光子を通過する光通過の増大を招く。こうして、厚みもしくは屈折率の変化は光度の変化に反映され、それは次に従来の技術を用

を保持する。重#1は分析評価プロトコルにおいてテスト表面#4を乾燥させるために使用されるブロッカー#2を含む。テスト表面は装置#3の上に設置され、洗浄工程を容易にする。保護カバー#8と#9がブロッカー#2と吸収材#6を装置内の適所に保持する。

第3のコンセプトは#2で表される反応性領域を含む、光学的に活性な検体反応性テスト表面#1を含む（図12の下部参照）。反応性領域#2はスポットコーティングにより、受容性層の選択的不活性化、もしくは反応領域間の物理的障壁により作ることができる。試料は反応領域（#2）に塗布され、次にすすぎ液と余分な試料が排水口#3を通して洗い出される。

別の配置では、テスト表面は線の縁の片方もしくは両方にあるフィルター材で一面の縁のストリップとして作ることができ、96井戸の配置の中に適合するように配置される。

#### 器具使用

試料がテスト装置の表面と接触した後、器具を用いて検体結合を検出することができる。試かる器具の1つはSagax Ellipsometerである（米国特許4,332,476、4,655,595、4,647,207、及び4,558,012を参照、その開示をここに完全に挿入し、本明細書の一部とする）。この技術にふさわしい別の器具は伝統的なナル楕円偏光計、薄膜アナライザー（図14参照）、プロフィールメーター、偏光計等を含む。干渉度がテスト表面構造に含まれる場合、定量分析には単純な反射率計（図14参照）が適切である。

図13において、光とテスト表面の相互作用を検出する先行技術の方法が示されている。先行技術においては、試かる検出を可能にするために2つの偏光子が設けられる。特に、#1はこの先行技術の器具において使用される白い光源に相当する。多色光を発生させるために標準的なハロゲンランプが使用される。光は位置#2において偏光子に入射し、次に直線的に偏光される。直線偏光された光は、テスト表面#4に対して70°である基準表面#3に衝突する。直線偏光さ

いて測定できる。この方法で比較楕円偏光計を使用して、+/-5Åまでの解像度が達成できる。従来の楕円偏光計と異なり、比較楕円偏光計は幅広い視野測定を可能にするように設計されている。この特徴は反応領域全体の同時測定を可能にする。従って、異質結合もしくは反応パターンによる測定誤差は生じない。

本発明の応用にとって、より有用な基準表面は均一なものである。分析されるテスト表面が視覚的解釈のために着色信号発生用の全ての要素を持っている場合、基準表面も光学薄膜コーティングを包含しなければならない。この付加的なコーティングは器具を使用する分析には必要である。テスト表面上の厚みもしくは質量の変化により生じる信号を最大限活用するために、基準規格はテスト表面、基板、付着層、及び受容性材料よりおよそ50〜100Å薄くするべきである。これら2つの表面があまりに近接して同相すると、厚みもしくは質量の小さな変化が強度に生じさせるのは、元の質量強度に対してわずかな増加だけである。質量強度がある最低より上であるか、あるいは十分に明るい時、わずかな厚み変化に対して強度の変化は劇的に増加する。この基準表面で、厚みもしくは質量の全ての変化は、テスト表面の初期の読みに対して検出器で測定される光の強度において劇的な変化を生じさせる。強度の変化は塗布次第で厚みの増加あるいは減少を反映することができる。実施例8、12、13、16、及び17を参照。器具を使用した読みプロトコルは実施例21に示している。

テスト表面上での特異的な結合反応の分析のために、多数の修正により比較楕円偏光計の性能が大いに改善される。元のデザインは表面検査のために観察者の目に頼っている。

図14において、偏光子が全く設けられない2つの装置が示され、その場合薄膜は1つのフォトダイオード、フォトダイオードアレイ、もしくはCCD検出器配列か、あるいは反射率計、光電子増倍検出器のいずれかにより分析できる。

検出器は増倍レンズが元の器具に配置される場所に取り付けられる。更にそれは光の一部を検出器に反射させ、残りを試料の視覚的配列のために増倍レンズに反射させるため、部分的に囲められた鏡またはビームスプリッターセットを

45°に組み込むことにより、光路側に対して90°に取り付けられる。鏡が光路に挿入された場合、検出器に達するスポット強度は利用できる光の断片にすぎなくなる。検出器が傾なしに光路の中に直進置かれる場合、試料強度の100%が検出器に達する。ビームスプリッター及び検出レンズが鏡度の中に含まれる場合、注意しないと、検出器上の光学信号入射を低下させる漏光が導入されることがある。

フォトダイオードアレイは個々のフォトダイオードを反応領域もしくはスポットの強度を測定するために供するようにプログラムすることができ一方、他のフォトダイオードアレイが背景を測定したり、あるいは領域を制御する。スポット強度及び背景強度の同時測定により、テスト表面背景のために各々の読みが正確に訂正される。

線形アレイもしくはマトリックスアレイのいずれも使用することができる。線形アレイはアレイにおいて利用できるサイズ及び解像度に依存する、1つの予め設定された試料スポットの軸に沿った測定だけを行うことができる。マトリックスアレイは全反応スポットと背景の測定を行うことができる。

器具は更に、如何なる背景信号も排除することなく、真なるスポットがフォトダイオードを達することができるよう、可変拡大鏡もしくはズームレンズを含むように修正することができる。

特に、2つの異なる器具が図14a及び14bに図式的に示されている。増倍アナライザ（図14a）は単色光源#1を使用する。光が充分直線偏光されない場合、位置#2にある偏光子が光を偏光するために使用される。偏光子#2は光の最大強度がテスト表面#3へと通過できるようにするために配置されなければならない。初期偏光子を相殺することにより、入射面に対して垂直に偏光された光成分が、入射面に対して平行に偏光された光に加えて、表面と相互作用できるようにする。光は法線から50°〜75°外れ、ブルースター角から充分に外された角度でテスト表面#3に衝突する。偏光子/検出器はテスト表面に対する入射光源と同じ法線からの角度で設定される。偏光子は全体の光の吸収度のために

偏光子を配列するセッティングを越える2°〜15°に設定される。法線から30°〜40°外れた入射角は非常に希釈した試料の適切な解像度を提供しますが、全ての応用に対して充分な範囲を提供することはできないかもしれない。第2の偏光子、もしくはアナライザ偏光子は、光が65°以上の角度で表面に入射する場合、背景信号を適切に最小限にすることはできない。しかしながら、動的範囲は背景信号に於ける電子的減少のために確保するのに充分である。光は検出器#5で測定される前に、テスト表面#3から位置#4において偏光子/アナライザを通過して反射される。検出器は1つのフォトダイオードであっても、あるいはフォトダイオードアレイであってもよい。ブランクのテスト表面が試料位置に置かれ、第2の偏光子を配列するために使用される。第2の偏光子は、最低限（検出器への光の最大吸収度）から少しだけ外れるように、第1の偏光子に対する角度で配置されるべきである。このように、テスト表面の背景は低い検出可能な信号を生み出すが、光強度の変化は今や厚みの変化の関数である。実施例26を参照。

反射率計（図14b）は色の変化または強度の変化の測定を可能にする非常に簡単な器具である。位置#1において、標準的なハロゲン光源が使用される。これは多色光を提供する。光源#1は最大強度の入射光がテスト表面#2に衝突するように、テスト表面#2に対して配置される。検出器#3は増倍面光電管等であってよい。光がテスト表面#2に衝突する角度は、検出器#3がテスト表面#2に対して配置される角度を決定する。

図15において、1つの特殊な例では、半反射鏡がズームレンズと検出レンズの間に45°で導入された。視野の中間に、焦点を合わせて適切に配置された検出レンズ内に、標本の十字線が設定された。十字線は平均試料スポットサイズに合うように選択された。光路の中心線上に、光学軸から90°反射されて、十字線のサイズに合うマスクが設定された。十字線に対する鏡の中心からの距離は、マスクに対する鏡の中心からの距離に等しい。鏡は、十字線内に見られる画像がマスク内に見られる画像と同一であるように、ねじを調節して取り付けられた。検

ミリメートルの距離で、マスクの背後に、マスクを通過する光、及び従って選択された画像からの光を絞り取るためにだけ配置される光電性セルが設置された。半反射鏡は二次画像が第2の表面から現れるような厚みのものである。これはビームスプリッターとして適切に設置された薄いマイラーノンブレンを用いて除去される。

白光または単色の一定の光源が、フィードバック能力を持つ電源を用いて提供される。ランプの光出力を監視するフォトレジスターが、元の器具のランプハウジングの内面に設置される。光出力が変化すると、対応する抵抗変化が発生し、それによりランプに送られる電流/電圧に影響を与える。

電源はフォトレジスターが遮断される間に、ランプに+15V<sub>DC</sub>を送るように設定される。フォトレジスターが接続されると、電源は+15Vの電源で作られるレベルで光出力を維持する。器具が定量分析に使用される場合、一定の光源が必要である。更に、器具はフォトダイオード検出器増倍器の出力が、コンピューターまたは他の専用装置におけるアナログ・デジタル変換機ボードに出力できるようにする。BNCポートで修正されてもよい。専用装置もしくはコンピューターは入力信号を読み、増倍し、入力を記憶し、増倍された入力を操作し、つまり、統計的分析等を行い、そして入力データ及び入力から引き出されたその他の必要な計算を印刷する。

特に、図15は図13に示した先行技術の器具の修正を図式的に示している。一定の電源が位置#1で使用される。電源は白い光源#2と検出器#12の両方に供給する。白い光源は標準的なハロゲンランプであり、多色光を提供する。前述したように、光は位置#3で偏光子を通過し、直線偏光される。偏光子#6は位置#3にある偏光子に対して垂直に、交差するように置かれる。基準表面#4とテスト表面#5は前述した通りである。この器具では、光が偏光子#6を通過する時、光は位置#7にあるビームスプリッターに衝突する。このビームスプリッターは、光の一部が検出器#12で受け取られ、一部が位置#11にあるCCDカメラで受け取られるように、光を分離させる。CCD#11はユーザーがテスト

表面#5を器具の視野の中心に配置できるようにする。検出器に分離される光は位置#9でマスクに衝突する。マスクはテスト表面#5上の試料スポットが十字線#10の中心に正しく置かれる時、マスク#9を通り検出器#12へと通過する光が試料スポットからのみ反射されるように、位置#10で十字線に合えられる。位置#8のズームレンズは十字線に対する試料スポットの位置付けを助ける。

上述の比較器具のために使用される光路は多数の応用のために望まれるものより大きい。以下の修正案では光路を減少させることが可能である。レーザー光源（ガスレーザーまたはレーザーダイオード）から放出される光は既にコリメートされ、偏光されているので、コリメーティングレンズシステムは簡略化もしくは省略できる。直線偏光子が光源に直接して配置される。この偏光子はレーザーがしばしば偏光されるので必要でないかもしれない。基準表面は試料表面に対して60°〜70°に配置される。基準表面及び試料表面の入射面はお互いに直交する。アナライザ偏光子は最大吸収度が基準位置と試料位置に置かれる2つの同じ表面のために発生するように配向される。両偏光子はそれらの表面が光ビームに対して垂直に配置されることが重要である。信号を増幅、処理し、記憶するために、適切に小さな検出器とエレクトロニクスを使用することができる。高精度を得るために、偏光子は10°の吸収度以上を供給するべきである。図18を参照。偏光子は光源と検出器の表側に建てられているが、図ではラベルによる分離はされていない。

高いアナライザは前述の器具の基準表面の要件を取り除き、サイズの縮小を容易にする。比較に基づく器具は特別な基準表面が使用される各タイプのテスト表面のために設計されることを求める。基準表面を変化させる手段が提供されない限り、これは光学基板の範囲、及び所定の器具と互換性のある光学領域の範囲を制限する。この新しい器具はアナライザの簡単な調整により、薄膜と光学基板の如何なる組合せをも容易に収容する。器具は厚みの優れた解像度を提供するかもしれない。この器具と修正された比較内偏光計では、9 Vの電池もしくは他の再充電可能な電源により電力を供給することができる。このプロトタイプは開口数、画像の明るさ及び焦点における増加を可能にする。そのため、使用される倍率のレベルをより高くすることができ、それはより小さなスポットサイズでの作業にとって重要である。更に、試料は比較内偏光計で可能であるよりもっとお互いに近接して並べられてよい。

特に、図16は図13の先行技術による器具の改良を図式的に示している。この場合、多色光源#1が使用される。小型レーザーが使用される。偏光子は位置#1において光源の真横に置かれる。図13においてテスト表面#4の視覚検査を提供するために、先行技術の器具において使用されるレンズ系は取り除かれ、金光路において減少を達成できるようにする。テスト表面は位置2において試料台に休止するように配置される。光は基準表面#3に衝突し、図13の先行技術の器具に関して前述したように、槽状に偏光される。光は基準表面#3から、試料台#2の上に置かれたテスト表面に反射する。一定の電圧を供給し、検出器#5を制御するために、小さなエレクトロニクス制御ユニット(#4)が組み込まれる。1つのフォトダイオードが検出器#5として使用される。位置#8にあるダイヤルは試料台#2を動かし、テスト表面の位置を制御するために使用される。試料台#2は試料スポットを検出器#5に整列させる予め決められた停止位置を持っている。試料スポットからの信号だけが検出器により測定されるように、試料スポットが配置され、検出器#5がマスクで覆われる。第2の偏光子が検出器#5の直前に置かれる。

3の生物種のために、検出器には特に反応性生物粒子を使用している。金属基板は励起粒子をトラップ(多重反射)に向けさせ、検出器から遠ざけるように向け直すために配置される。

この特性は、励起粒子が金属基板により暗い闇に向けて反射されるようにするため、光子計数システムを基板から離して配置する。闇は闇を打つ全ての光子を吸収し、それは検出器におけるノイズを減少させる一方、基板から誘導される多くの信号が反射のために光子計数システムに移動する。検体は真空のある培養において反応させられる。

このアプローチのため、光源から始まり、暗い闇の中で待機する励起格子の通路には、高い反射性の金属表面と生物粒子以外は何も存在してはならない。入射角が反射角に等しく、信号検出システムが基板に対して垂直で、基板からある距離を置いて配置されることにより、励起粒子は検出システムに向かって散乱しないであろう。

本発明は反射基板と受容性の生物層の間の付着層に依存する。この基板と生物層の間の重合体層は蛍光信号の発生に影響を与えない。付着層は次の化学製品から選択することができる: チンドリマー、スターポリマー、分子自己組立ポリマー、重合体シロキサン、及び環形成ラテックス。これらの表面の製造方法は実施例5に記載されている。反射基板もしくは支持台(光学的に活性な表面)は、単結晶性シリコン、ガラス/アモルファスシリコン複合材、金属、セラミック、多結晶性シリコン、プラスチック/アモルファスシリコン複合材、及びこれらの材料の複合材から選択できる。これらの材料の製造方法は上述した通りである。この方法は試料の量を二倍にすることなく、励起通路長を二倍にする。それに加えて、反射基板を励起光に対して耐反射性材料で被覆することで、蛍光方法に關連してしばしば発生するノイズを除去するが、吸光度が空気と媒の界面のみで発生するので、励起を可能にする。適切な材料としては、酸化ケイ素、ケイ素/二酸化ケイ素複合材、オキシ酸化ケイ素、二酸化チタン、チタン酸塩、ダイヤモンド、ジルコニウムの酸化物、及び酸化ケイ素がある。材料及び材料の厚みは励起波長

#### 蛍光方法

更に、これらの光学的に活性な基板、もしくは固体支持台が重点的に取り上げられる。器具を使用する態様は反射蛍光方法である。ブルームは均質フォーマット、異質フォーマット、格状フォーマット、もしくは直線的フォーマットにおける免疫分析評価、酵素分析評価、核酸分析評価において生み出される。信号発生はこの方法において標準に依存しないが、該方法は現在の入射光の経路長を二倍にすると共に、検出器における収集効率を高める。光学的に活性な基板、もしくは固体支持台はシリコンウェーハ等の磨かれた反射材料であってよい。

標準的な蛍光光学において、励起光は一度試料を通過する。図17を参照。反射基板が使用される場合、蛍光種の励起は入射点及び反射点で発生する。一般に、主として検出器のデザインを簡略化するため、蛍光放射があらゆる方向に放射されても、放射(ブルーム)は励起線から90°外れて検出される。例えば、ポイント検出器では、励起エネルギーは検出器に突き当たらないようにされるべきである。回折格子が励起線と共にしばしば使用され、最大ブルームは励起波長から区別される程度に動かすことはできない。これは高強度の励起線からの影響、及び増幅と相対置からの散乱を減少させるために要求される。反射基板では、検出器及び入射光は近接から等しい角度である。

試料を通る励起光の通過数を増加させることにより、蛍光分析評価の感度を高めるための試みが為されてきた。このアプローチは焦点調節のためにより複雑な光学、高い出力光量、及び大きな収集光学を必要とする。この方法は更に細胞からの背景ブルーム、及び干渉生分子または固有の生分子を増加させる傾向がある。試料の容量及び/もしくは光路長を増加させることにより、感度の向上も達成できる。本発明の方法はこれらの方法に見られる複雑さなしに、感度の向上を提供する。

英国特許第2 065 298 Aは、高純度により生じる反射性金属基板を使用する、蛍光分析評価について記載している。検体の割合及び蛍光ラベルに結合される第

の光を抑制するように選択される。選択される励起波長は特殊な染料(見蛍光団)もしくは使用されるラベルに依存する。これらの材料は上述したように製造される。入射励起の角度が狭くなると、検出器に通ずる励起光の量を減少させる助けをする。

本発明では如何なる数の蛍光分子も使用できる。フルオレセイン、ローダミン、及びローザミンを含むキサンテン染料等の蛍光分子は本出願に選んでいる。それに加えて、これらの染料のアミノ及びカルボン酸、もしくはイソチオシアネート代替品も選んでいる。1-ジメチルアミノナフチル-5-スルホナート、1-アミノ-8-ナフチルスルホナート、及び2-ポートルイジニル-8-ナフチルスルホナート等のナフチルアミンも有用である。生物分子に対するこれらの化合物用の複合プロトコールは、当業者に公知である。二次抗体、酵素基板、核酸プローブに対して、あるいは関係のある検体用の適切に選択される、特異的な受容性材料に対してラベルを添付してもよい。

本発明において、光学的に活性な、もしくは反射性支持台は、光学コーティングまたはAR膜があろうとなかろうと、適切な重合体で被覆されるであろう。次に重合体層は関係のある検体、つまり検体に対して特異的な受容性材料で被覆されるであろう。生物学的に反応性かつ反射性基板は関係のある検体を含むと思われる試料と接触させられ、検体を表面に結合するのに十分な時間の間培養されるであろう。検体は表面に接触すると同時に、あるいは逐次、蛍光材料のラベルが付けられた二次的受容性材料と重合されてもよい。いずれの場合にも、ラベルは検体ブリッジを通り表面に固定化される。固定化されたラベルは励起光線に露出され、検出器が蛍光度を測定するであろう。ブルームの量は関係のある検体の濃度に対して直線的に、逆に、あるいは間接的に測定できる。酵素の活動もしくは核酸の検出のための同様の計画が当業者によって容易に考えられるであろう。光源及び検出器は標準的な蛍光光学要素の組合せから選択できる。

#### 検体

## 連鎖球菌

グループB連鎖球菌(GBS)、無乳症連鎖球菌は新生児及び母親の症例、死亡率の主要な原因である。新生児の感染は敗血症及び髄膜炎を含む一方、分娩後の生体は子宮内膜炎、しゃう毛羊膜炎、及び敗血症を含む。新生児にとって、初期発病疾患が出生から1週間の間に発生する。疾患は呼吸困難、敗血症、及びショックにより特徴付けられる。米国だけで1000人の出生当り1.9~3.7例があり、死亡率は28%~50%であり、感染した幼児の30%が髄膜炎を起している。後者のグループでは、50%が持続的な神経的損傷に苦しんでいる。年間約2000人の新生児の死亡の原因がGBSの感染であり、米国だけで年間ヘルスケアにかかる費用は5億ドルを超えると概算されている。母親の臍部/胎のGBS連鎖と幼児の感染との直接的な相互関係が検証されている。

GBSは更に、出生後3か月以内に発生する末期発病疾患を発生させる。これらの場合の病状は中枢神経系の障害、髄膜炎、及び敗血症によって特徴付けられる。これらの疾患による死亡が幼児死亡率の約20%を占めている。

母親の感染は主として臍部/胎及び肛門である。妊娠中の婦人の5%~30%がGBSで感染されている。母親の感染は早産、難産、早期羊膜炎、分娩時の熱、未熟児出産と共に初期発病疾患の原因となることがある。母親の出産前の処置が新生児の結果を大きく改善し、GBSの垂直伝染を除去することができる。しかしながら、母親の頻繁な再感染のため、診断/治療プログラムが妊娠初期であれば、母親のGBS感染の診断、及びその後の処置は垂直伝染を除去することができないかもしれない。初期診断はGBS感染のため危険に曝されている新生児を特定することができる。しかし、分娩時にGBSの素早い、敏感かつ正確な診断のために文書化する必要がある。該かる診断上の道具が利用できれば、母親の予防処置が分娩発生時に開始でき、幼児に対する処置は誕生時に始めることができるであろう。これは新生児に対する危険をかなり減少させることが検証されている。

GBSは5つの血清型から成る。これらは1a、1b、1c、11、111と

称される。5つ全ての血清型は臨床感染に包含されている。5つ全ての血清型は独特である特異的な多糖類を含み、加えて血清型を唯一特定する抗原をも含む。特異的な多糖類が全ての血清型を特定するにつれて、この抗原はGBSの特定の免疫学的的方法の焦点となってきた。GBS診断のための「ゴールドスタンダード」はいまだに培養特定である。このプロセスはGBSの正確な特定のために24~72時間かかる。危険の大きい妊娠はしばしば培養結果が利用できるずっと前に分娩を完了するであろう。

GBSの検出のために多くの市販されている様々な免疫学的テストがある。これらの方法の臨床評価は12%~92.3%の範囲の臨床感度を表し、平均臨床感度は50%~60%である。分析的感度は $7.6 \times 10^3$ ~ $2.1 \times 10^5$ セル/範囲であると報告されている。これらの方法は素早い診断を提供する一方、時間を得たGBSの特定のために臨床上の必要性を重点的に取り上げるために必要な感度を備えてはいない。

例えば、No.921998はGBS用の分析評価を記載しており、そこでは固体支持台がグループBの特異的な多糖類の1エпитープである、トリラムノースエイトープと特に相互作用する単クローン性抗体で被覆される。モノラムノースエイトープに対して特異的である多クローン性抗体が1つの発生ラベルに結合される。この方法の分析的感度は $3 \times 10^4$ セルに設定される。感度は被覆剤の最適な濃度を選択してのみ得られる。該方法はGBSの優勢なエイトープにのみ専念する。「抗原被覆剤はGBS多糖類抗原のトリラムノースエイトープに特に結合するための親和力を持つ」、そしてこの抗原被覆剤は更に「他約めしくは少なくとも優勢的にトリラムノースエイトープと相互作用することができ、この被覆剤とグループB連鎖球菌多糖類抗原の他の成分との間の相互作用は、非常に低率であるか、もしくは無視できる程度である(つまり、トリラムノースエイトープとの相互作用はGBS多糖類抗原またはGBS感染の検出及び/診断のために充分特異的である)」。分析評価は綿綿を抗原被覆剤で被覆された容器の中に置くことを必要とする。容器は非常に高い領域/容量率を持つ。抗原は検出プロトコ

ルを用いて、5~20分かけて綿綿から抽出される。トリス及びブッティンを含む緩衝液がそれに添加され、綿綿が取り除かれる。抗原マーカーが添加され、反応物は更に10~15分間培養される。次に容器は完全に洗浄され、基板が10~20分間添加される。それから反応が停止され、その結果が分光光度法により読み取られる。

本発明において記載されるGBS検出法は、30分以内で得られる感度を達成する。テスト結果は解釈しやすく、病室あるいは分娩室での使用に適している。本発明の光学テスト表面は独特な付着層の故に改良された感度を提供し、如同なる固体的な多クローン性抗体あるいは単クローン性抗体ともうまく作用する。抗体は必要な臨床感度を達成するために異なるエイトープ特異性を呈する必要がある。GBS抗原に対する様々な特異性及び親和性の組合せである抗体調製品は、サンドイッチフォーマットの両サイドともうまく作用する。しかしながら、異なるエイトープ特異性を持つ抗原が本発明においては有用である。

## クラミジア

クラミジアトラコマティスは生きている細胞で培養されなければならない、つまり組織培養が必要な真正細胞内生物である。クラミジアは15のserovarを持ち、主としてトラコマ、増殖性、リンパ肉芽腫、性病、非淋菌性尿道炎及び肛門炎等の、人の眼の疾患及び性伝染の疾患を引き起こさせる。米国で年間およそ3~400万のクラミジアの症例がある。非常に専門的な研究所のみがクラミジアを培養するのに成功しているが、収率は低く、門外漢が深刻である。貯置状態が培養のための生物の生存能力に影響を及ぼす。推薦される培養プロトコールはMcCoy細胞で処理されたシクロヒキシドの接種、盲通針、及び封入体の蛍光着色を含む。産前産後に材料の滅菌及びソニケーションは陽性の培養収率を増加させる。サンプリングはサンプリング場所を固める細胞及び粘着を含む。

培養技術に加えて、多くの直接的な免疫法及びELISA法が開発されている。これらの技術は低レベルのクラミジア感染をしている患者を検出するため、

もしくは無症候性である個人にとっては不適切な感度を提供する。100IFU(包被形成単位)以下を含む試料に対して、培養に対する44%の全体的な感度が報告されている。利用可能な方法は100IFU以上を含む試料に対して82%の感度を表している。

更に、多くのグラム陰性細菌も、クラミジアによって作られるものに類似する生物特異的リポ多糖類(LPS)を作り出す。生物の検出及び特定はこの抗原の免疫学的反応に基づいて為される。生物特異的多糖類も有用であるかもしれない。グラム陰性細菌はクラミジアブシクテ、大腸菌、ブソイドモナス菌、アゾバクターヴィネランディ、アイログネス菌、淋菌、トレポネーマパリス、葡萄球菌、シグラ、ヒドログノモナス菌、サルモネラ、ヘモフィルスインフルエンザ、カンピロバクター、ヘリオバクター、及びレジオネラを含むが、それらに限定されない。

米国特許4,497,809は、シリカ、シリコン、ガラス、金属、もしくはプラスチック等の露出した固体支持台に対する抗原の特異的な吸着に基づく分析評価を記載している。固体支持台に対する抗原の化学的もしくは免疫学的結合はない。分析評価プロトコールは抗原を遊離させるために溶解された試料とビーズの混合を含む。抗原のビーズに対する吸着の後、ビーズはすすぎ、新しい抗体に送られる。クラミジア抗原に特異的な抗体が添加され、所定の時間培養され、ビーズがすすぎ落とされる。蛍光発生ラベルに結合される、新クラミジア抗体に対して特異的な別の抗体がビーズと混合され、培養され、すすぎステップが続き、その後基板で培養される。

米国特許4,497,800は非特異的な抗原吸着のために露出した固体支持台を用いた、増殖のための分析評価を記載している。固体支持台は好ましくは炭化水素重合体、ポリステレン、シリカ、シリコン、ガラスまたは金属の、露出された、未処理の、被覆されていない支持台である。

米国特許4,959,303はグラム陰性細菌の検出方法を記載している。使用される固体支持台は特異的な結合タンパク質がなく、本質的にタンパク質がない。固体

支持台は正の電荷を所有することができる、露出した疎水性支持台である。分析評価プロトコルは、抗原が非特異的に表面上に捕獲された副クラミジア抗体と混合されることを求める。副クラミジア抗体に対して特異的であり、信号発生器に接合される抗体が追加され、次に基板が追加され、その後検出が行われる。支持台は水分を吸収しやすい、無孔質の水に不溶な材料であれば何でもよい。

米国特許5,030,561はアミジン改質ラテックス粒子もしくはポリスチレンを固体支持台として使用することによる上記アプローチの修正を記載している。抗原は非特異的に支持台に結合し、粒子が通過を通して液体相から固体相を分離するために使用される。濾過工程において使用されるメンブレンは、分析評価において使用される前に、界面活性剤及びピカゼインで洗浄されなければならない。基板の親水性はメンブレンに発生する。

米国特許第5,047,325号には、プラス電荷が追加される露出式あるいは被覆式固定支持体を使ってクラミジアや淋菌の抗原を検出する方法が詳細に記述されている。その固定支持体は、ガラス、セルロース、ポリマーなどから成る。プラス電荷体は、幅広いPH値において電荷を維持できるように原子価が好ましい。前記固定支持体上には、非特定抗体捕捉素が設置されており、陽イオン界面活性剤にてその表面を洗浄して除去する必要がある。なおサンプルは、細胞片を取り除くための予置フィルター処理しておく必要がある。

また、米国特許第5,075,220号では、固定支持体のLPS抗原のイオン相互作用を支援できるように陽イオン基をもつポリマー支持体を利用して、支持体は、抗原の反応測定動作前には、抗体や生物化合物などで汚れていないよう注意する必要がある。

本発明のクラミジア試験では、LPSや抗原を非特異的に捕捉することができる疎水性面を形成するため、重合シロキサン被覆をもつ固定支持体が使われる。この構成により、LPSの検出もできる。しかも、実験から、抗原の捕捉動作前に少量の抗体またはタンパク質のような非特定の生物質で疎水性面を被覆した場合、均一で最良の反応が行なえることが判明した。この追加の被覆処理

血清学的測定法は、ウィルスに対する宿主反応、つまりIgGの生成に基づくものである。しかし、IgGは数週間では生成せず、さらに感染が数月から数年は持続するため、診断確認が困難になる。直接抗原検出法は、進行性感染に対してはより効果的であるが、RSVに対しては前記の培養法や確認測定法と比較して反応が悪い。直接検出法には、免疫蛍光検査法、電子顕微鏡検査法、酵素連結免疫吸着法(ELISA)、および培養処理が含まれる。

#### HIV

免疫不全ウィルス(HIV)には、gp41、gp160、gp120、p66、p24、およびp18で示されるいくつかの特徴がある。p24ペプチドはHIV-1の核を編入する4つのヌクレオカプシドのうちのひとつであり、24,000ダルトンの分子量を有する。HIVウィルスの特定感染性は、gp120抗原に依存するが、gp41は、宿主細胞内へのウィルスの直接侵入を必要とする特徴をもつ。現在のスクリーニング測定法は、これらマーカーのうち一つ以上に対する宿主反応、つまり抗体生成検出法に依存している。現存する免疫学的検出法は、直接抗原検出法に十分な過敏性を与えるものではない。

現在では、HIV感染の最終的な確定は、ウェスタン(免疫性)ブロット分析法が基本となっているが、これらの試験は、判断の難しきばちろんのこと、多くの費用、および技術力が必要とされる。また、これらの方法が、現場条件にて実施される場合、関連実験施設の実験条件と比べて、通常その作用は劣っている。ウェスタンブロット分析法は、ウィルス殻膜タンパク質p17、p24、あるいはp55、ポリメラーゼタンパク質p31、p51、あるいはp66、そしてエンベロープタンパク質gp41、gp120、あるいはgp160からそれぞれ一つ以上を検出できるように構成されている。赤十字検査では、各グループにつき1つ、3つの陽性群が必要とされる。陽性結果を報告するためには、CDC検査ではp24、p31、gp41および/あるいはgp120/160を含む少なくとも2つの陽性群が必要とされるが、一方、FDA検査はp24、p

は、EIA、FIA、RIAなどの検出方法にも利用できる。本発明の方法においては、この非特定の生物質層により、沈着基体系との均一使用が可能となる。特に、疎水性支持体などの固定支持体と沈着基体系の組合せに依存するような異なるシステム装置にも、本測定試験構成の利点が適用できる。

#### RSV

呼吸系合胞ウィルス(RSV)つまりミクソウィルスは、幼児や児童などの下部呼吸気道の疾病に關与している。成人の場合、RSVは通常、良性的で無熱性の上部呼吸気道感染である。幼児期の最初の6ヶ月間において、細気管支炎全体の32~75%、そして肺炎の3~39%はRSVが原因で起こっている。これらのウィルスは、しばしば生命を脅かすものである。その有価物はまた、気管支炎や咽頭炎のような急性発熱性の呼吸系疾病に關与している。そのような有価物は冷凍保存あるいは高圧射熱される前の所定のサンプルを培養して生成され、鼻中または咽頭内の分泌液から検出されるものである。そのサンプルはHela、あるいはHe p2細胞の接種に使用され、結果がでるまで3~14日を必要とする。なお、RSVは晩秋から初春、そして晩春から初夏にかけて発生し、各発生ごとに3~5ヶ月間生存する。

初期のウィルスの診断で、医師たちは患者の症状を鑑査し、呼吸系疾病の病因を確認することができる。ウィルス性感染の鑑別には3種類の診断法を用いることが可能である。まず第一は、プロトコル確認に従った培養陰陽法である。第二に、ウィルス感染に対する宿主反応を検知する血清学的測定法、そして第三には直接ウィルス抗原検出法がある。

RSVの培養方法は、サンプルの収集およびガラスピースとの混合からなる。それには、通常には気管の分泌物と気管支肺胞の洗浄サンプルが利用される。ピースは、搬送媒体へのウィルスの分散のため、管腔破壊や局所効果によるサンプル細胞の破壊に利用される。このサンプルの一部は、細胞培養の育成に使われる。利用する試験法には、抗体結合反応作用と中和反応作用とが含まれる。

31、pg41、および/あるいはgp120/160が陽性となることが必要である。本発明は、1つ以上のHIVの特定抗原に対する宿主反応の検出のための、適切な光学プラットフォームを提供するものである。なお、抗原は、組合せあるいは個別に試験表面上に付与される。

#### 肝炎ウィルス

臨床的には、多種のウィルス性肝炎を区別することは困難である。それゆえ、原因となる因子の診断には、血清学的測定法が必要である。肝炎には5種類の分離型ウィルスが関与しており、それぞれA型、B型、C型、D型、そしてE型と称されている。本発明は、C型肝炎が非A型、非B型として見なされていたが、最近では非A、非B型の肝炎として認知されている。A型、および、E型肝炎は胆汁物や経口から感染し、急性感染を起こす。B型、C型、D型の肝炎は経口以外から感染し、急性や慢性の感染を起こす。HCVは、多くの場合には輸血による肝炎の原因となっている。個体に感染した多くのHBVは、無症候性で感染しやすく、またHBV感染は肝硬変や肝臓癌とも関連がある。肝炎における血清学的測定法の一つが、「学外面学」誌、92巻、55~68ページ、1992年に掲載されている。肝炎所有(Ags)抗原の各形態はウィルスの各形態と比べると独特で、HAVはHAVAgsを、HBVは表面抗原(HBsAg)、殻抗原(HBcAg)、そしてヌクレオカプシドの内殻構成要素(HEbAg)を有し、HCVは殻抗原の主要抗原性領域である殻ペプチドのN末端とともに、C100、5-1-1、C22-3(殻)、C33c(殻)を有する。さらに、HDVはデルタ抗原を備えているので、HBsAgの陽性反応から検出できる。HEVに関しては、その特性はあまり明らかになっていない。肝炎の形態は抗原検出、あるいは宿主抗体反応に基づいて決定判断されるものである。直接抗原検出法では過敏性が必要とされるため、現在の診断測定法では、特定抗原に対する抗体反応性により検出される。宿主反応はIgMまたは/あるいはIgGを生成し、感染の活性状態を作るため、抗体反応からの分離を必要とする。例えば、IgM抗HA



Vは急性感染を示すが、I D C抗HAVは慢性感染を示す。

本発明は、肝炎の診断のための有益なプラットフォーム検出法を提供するものである。まず、抗原の一つの組合せを、それら抗原に対する宿主反応を検知するため、試験表面上で不動態処理する。表面抗原、殻抗原、あるいは、e抗原などの一つ、あるいはそれ以上を被膜処理した試験表面により、HBVなどの肝炎ウィルスを特定する抗原を検知する。または、単一サンプルを使用しているHAV、HBV、HCV、HDV、およびHEV間を識別できる1種類以上の抗原で、試験パネルを被膜処理してもよい。そのようなスクリーニング試験は、可視法、定性分析法、あるいは全自動装置のいずれの方法でも実施することができる。抗体検知は、特にI g G、I g M、または両方に対応できる。

以下の実施例は、本発明の試験装置を最善に動作させるための方法であって、機器や目視採取記録に利用できる前記のそれぞれの被膜の効果的な組合せ作用例が記述されている。それら方法が、本発明と同様の効果をもたらすような試験装置を最善に動作させるのに適用できるのは、当業者にとっては明白であろう。

#### 実施例1：試験面

多様なレベルの拡散反射を生成するための異なるサイズの粒子で覆われたシリコンウェファを、窒化シリコンで被覆して、厚さが500オングストロームで屈折率が2.0のARウェファを作成した。この結果、金色の干渉色層が生成できる。最初に、ウェファの反射率と幾何学的特性を調べた。次に、これらウェファに下記のようにアミノシレンを塗布してから、抗A型連鎖球菌ポリクローン性抗体で抗体被膜を作成する。

試験面を、下記のような方法で、N-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメソキシレンを添加することにより化学的活性化した。

1. 前記のARウェファを、DC175ミリアンペアで250RFワットの陽極電流にて、0.710 r r rの酸素圧力で真空中で5分間酸素エッチング処理した。

2. ウェファを水晶ラックに設置して、5マイクロリットルのN-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメソキシレンの入った容器で真空乾燥器に投入した。真空を30分0.06 t o r rにして、1時間のあいだ乾燥器の温度を100度以上上げて、アミノシレンの高濃度層を作成した。

3. 20mlのPBS (調整塩緩衝サリン) 溶液内の20マイクログラム/mlのポリクローン性抗A型連鎖球菌と、10mMの硝酸カリウムと、0.8%のNaCl (pH7.2)と、1容重量のグルタルアルデヒドとを混合して、受容剤溶液を作成した。ウェファをベトリ皿上に置いて、前記の受容液を加えた。

4. そして、室温(約20℃)で攪拌槽内で15時間ウェファを培養した。

5. 培養の後、ウェファを脱イオン水で洗浄して、不要な抗体を除去した。

6. 安定化溶液で培養してから、試験面を1時間攪拌槽内で培養した。安定化溶液は、PBS内の2% (w/v) のスクロースと、2ug/mlの酸性加水分解カゼインと、1% (v/v) のグリセロールとから作成されている。

7. 安定化処理の後、試験面を脱イオン水で洗浄して窒素環境で乾燥させた。ウェファを、室温で2分間培養して、実施例14および15に記述されているラヂックス2次試験と、多様なレベルのA型連鎖球菌抗原を備えるサンプルとを反応させた。スライド部は、脱イオン水で洗浄して、窒素環境で乾燥させた。混合したシラン、あるいは加えられた抗体の容量には、何の変化も見られなかった。

その結果は、表1および表2に示されており、それによる非線形は、どの角度からでも線形以上の高い感度で観察することが可能であることが分かる。

表 1

ラップの粒子の 大きさ	粒子の平均の 大きさ	Dek-tak'の モデルン	Dek-tak'の RMS	コメント
10-20ミクロン	15ミクロン	20ミクロン	2995	拡散、角度依存性なし；色：すべての目視角で明瞭
20-40ミクロン	30ミクロン	N/A	N/A	拡散、正反射性最小、角度依存性は小さい；色：ほとんどの目視角で一定
40-60ミクロン	50ミクロン	N/A	N/A	拡散：少ない、正反射性は比較的大、目視角依存性比較的大、色：角度依存性を示し始める
80-100ミクロン	90ミクロン	40ミクロン	4779	拡散：わずか、非常に正反射性で強い角度依存性；色：目視角によって変化する

表 2

各種の重ねたウェファ表面でのストレップA検定の目視判定結果  
ストレップグループA抗原の濃度

ウェファ	0.000	0.008	0.016	0.032	0.064	0.128	0.250	0.500	1.000
15 micron	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
30 micron	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
50 micron	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
90 micron	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

#### 実施例2：ガラス基板

直径4インチのホウケイ酸塩ナトリウムのガラスに、そのガラスの反射率を効果的に増加させて、後面反射を遮断できるよう、厚さが10-50オングストロームのアルミニウム（クロムでも可）の薄膜層を塗布した。その上に前記のような熱蒸着法によって無定形シリコンを被膜して、厚さが500±3%オングストロームの窒化シリコンの層を作成した。

前記の試験表面上に、実施例1にて記述されているような抗体被膜を作った。本実施例では、その試験表面の抗体被膜層には、A型連鎖球菌抗原（GAS）に対するポリクローン性抗体を使用した。100μlのGAS抗原溶液あるいは非希釈液と、50μlの非GAS表面活性剤粒子とを混合して、実施例1にて記述されるような方法で検査した。それからGAS測定法により、シリコンウェファ上の窒化シリコン被膜に対する試験面との比較を行なった。その結果は、表3に示されており、ガラスはシリコンと同様に基板として利用できることが分かる。

表 3

抗原の希釈倍率	ガラス基板	シリコン基板
0.0	-	-
1:256	+/-	-
1:128	+	+
1:64	+	+
1:32	++	++
1:16	++	++
1:8	+++	+++
1:4	+++	+++
1:2	+++	+++
直接	+++	+++

## 実施例3：AR試験面の作成

本実施例では単結晶シリコンの光学的基板を、ARフィルムに必要な平方微分特性値に近似した酸化シリコンなどの厚膜層（750～800オングストローム）で被膜した。その厚膜層を、前記のように基質に対して約50オングストロームの厚さの化学エッチング処理を数回行なって選択的に除去した。つまり、基板表面全体に干渉色段階のくさび形状を生成した（図3参照）。それから基板を接着層と受容剤で被膜し、酸性、低粘性、および中間粘性のサンプルを使用して測定を行なった。

接着層、受容剤、測定プロトコルのどのような組み合わせでも、この分析方法を行なうことができる。本発明の実施例において、実施例5で記述されるように、T膜をもつシリコンで被膜したシリコン上にある酸化シリコンのくさび形状を使用した。そしてARフィルムを覆うシリコンを、実施例11で記述されるように、ポリクロニン性A型非連続球面抗体で被膜処理した。その測定プロトコルについては、実施例19にて記述されている。測定サンプルは、各くさび形状

0（±3%）のフィルムが作成される。

光学基板は清浄な状態、つまり不要な微粒子の無い状態でなければならず、被膜液内に微粒子が存在しないよう注意する必要がある。スピン被膜法を實施する場合、微粒子がフィルムの被膜不良を起すためである。

## 実施例5：被膜層の生成

ここで説明する被膜層材料の名称の定義は、以下のとおりである。

1. PEI（トリメトキシシリプロビル）ポリエチレンイミン。
2. PEI/DMDCS-PEI+ジメチルシロキサン。
3. ポリスチレン
4. MSA-スターバースト、第5世代。
5. Tポリマー・アミノアルキルT構造ランチ点ポリジメチルシロキサン。
6. TC7A-フィルム形成ラテックス。
7. DMDCS-ジメチルジフェニルシロキサン共重合体。
8. Mercapto-メルカプトプロビルメチルジメチルシロキサン。
9. BAS-N（2-アミノエチル-3-アミノプロビル）トリメトキシシロキサン。
10. PBD-トリメトキシシリル調製ポリブタジエン。
11. PAPDS（メチルフェニル）メチルジシルーメチルアミノプロビルメチルシロキサン。

これら化学物質を、以下の被膜層を形成するため使用した。

1. PEI（ベトアルカ、ペンシルバニア州プリストル）

接着層の1：500の希釈液をメタノールで生成した。300マイクロリッタのこの母液を、100mmの短女使用シリコンウェファ上にマイクロバットで点滴した。この場合、自動のエアゾール装置やスプレー装置を使ってもよいけれども、ウェファがフォトレジストスピン被膜装置上を7,000rpmで回転しているの、マイクロバットを使用すべきである。スピン被膜装置は、多数

（異なる厚膜層）の中心部に配置した。本測定を終了後、単数あるいは複数のくさび形状の測定のため基板全体を検査した。それらくさび形状の特性は、1）最終感度反応性、つまり最も検知しにくい非特定結合性、2）最高感度性、そして、3）最終視覚コントラスト性である。50オングストロームの厚膜を選択した場合、基板を均一に被膜することにより、最初の真鍮で選択した最も厚い厚膜（550オングストローム）では、10オングストロームの厚さでエッチング処理が行なわれたものに比べて、より高い解像度が得られた。この方法では、生物質の組合せに因る最も「明確」な色変化が得られる必要光学厚膜の選択が速やかである。

## 実施例4：TIO光学被膜の作成

すべての測定法は、使用物質の容量が基本となっている。有機チタン酸塩はデュポン社から入手でき、その製品名はタイザー（Tyzor）TPE（チタリソプロビルチタネート）であるが、その代わりにチタリソプロビルチタネートを使うこともできる。1mlのTPTと、3mlの水溶液と、3mlのアルコールと3mlの脱イオン水と、10μlの3MのPC171フルオロサーファクタントとを混合した。本出願例では、イソプロパノール、1-エタノール、アルコール、エタノール、あるいはアセトンと水と共に使用してもかまわない。エタノールはチタンの沈殿の原因となるため、避けたほうがよい。

300～500マイクロリッタの混合液を、許容スピン被膜法により形成した均一フィルムと光学基板に加えた。フィルムの厚さは、495±15オングストロームとする。そして基板を250℃で2時間のあいだ加熱するか、あるいは400ワットで2分間マイクロウェーブ熱処理することで、そのフィルムを硬化させた。本実施例では、光学基板として、単結晶シリコンウェファを使用した。そのため、許容温度限度値も使用される光学基板の種類によって異なる。プラスチックの場合、250℃硬化処理に耐えられないが、ガラスでは耐えられる。ここで選択された硬化条件においては、本出願例にて適切とされる屈折率が2、

の基板を迅速かつ簡単に自動加工処理することが可能である。ここでは、前記の接着層を作成するためにスピン被膜装置を使っているが、本発明においては、それに限定されるものではない。その他の溶解沈着や真空沈着などの方法が利用できるものも、当業者にとっては明白であろう。PEI被膜基板は、100℃で0.1mmHg条件下にて60分で硬化した。周知の楕円偏光測定法で測定する最終被膜層は、80オングストロームが好ましいが、その他の厚さでも構わない。

2. PEI/DMDCS：（シグマ化学、ミズリー州セントルイス）

PEI被膜基板は、さらにDMDCSで加工処理される。これにより、膜状PEI膜にそったランチ点が生成され、Tポリマー被膜面の動きをもつ試験表面が形成される。2%のDMDCSの100ミリリットル溶液を、1、1、1-トリクロエタン（v/v/v）に作成した。PEI被膜基板を、25℃のDMDCS被膜液に60分のあいだ浸漬した。浸漬後、前記基板をDMDCS被膜液から取出し、95%のエタノールで洗浄して、超音波液で乾燥させた。周知の楕円偏光測定法で測定する最終被膜層は、200オングストロームの厚さが望ましいが、他の厚さでもかまわない。

3. ポリスチレン（ベクトン・ディッキンソン、カリフォルニア州オックスフォード）

約0.05グラムのポリスチレンを、2ミリリットルのトルエンで溶解した。その溶液を、前記スピン被膜装置にて処理した。基板は、その使用前に25℃で60分のあいだ硬化処理を行なった。最終被膜層は、200オングストロームの厚さになることが望ましいが、他の厚さでもかまわない。

4. MSA-スターバーストポリマー（ポリサイエンス、ペンシルバニア州ワリントン）

第5世代スターバースト（0.5%固体）の1：4希釈液をメタノールで生成した。200ミリリットルのその希釈液を、回転速度3500rpmのスピン被膜法にて基板に付着させた。この被膜層を、25℃で120分間のあいだ硬化処理を行なった。最終被膜層は、40オングストロームの厚さになることが望ま

## 特表平7-509565 (27)

しいが他の厚さでもかまわない。

### 5. Tポリマー (ベトラーチ、ペンシルバニア州プリストル)

Tポリマーの1:300 (v/v) 希釈液を2-メチル-2-ブタノールで生成した。被着層は、スピニング被着法にて基板に被着され、さらに使用前に、140℃で24時間のあいだ硬化処理を行なった。最終被着層は、100~160オングストロームの厚さになることが望ましい。

### 6. TC7A (セラディン、インディアナ州インディアナポリス)

30%の保存溶液をメタノールの固体0.5%に希釈した。300マイクロリットルのその溶液を、スピニング被着法にて基板に付着させ、さらに使用前に、37℃で120分間のあいだ硬化処理を行なった。この物質の最終的な厚さは240オングストロームになることが望ましい。

### 7. DMDPS (ベトラーチ)

シロキサン1:100 (v/v) 保存溶液をトルエンで生成し、スピニング被着法にて基板に付着させ、さらに使用前に37℃で120分間のあいだ硬化処理を行なった。最終被着層の厚さは、200オングストロームになることが望ましい。

### 8. メルカプト (ベトラーチ)

シロキサンの1:300 (v/v) 保存溶液をトルエンで生成した。被着、および硬化処理プロトコルは、PEIで記述したのと同じように実行した。最終被着層の厚さは、200オングストロームになることが望ましい。

### 9. BAS (ベトラーチ)

シランの1:100 (v/v) 溶液をトルエンで生成した。200マイクロリットルのこの溶液を、前記のスピニング被着プロトコルにて処理した。さらにウェッファを140℃の0.1mmHg状況下で2時間のあいだ硬化処理した。最終被着層の厚さは、30オングストロームになることが望ましい。

### 10. PBD (ベトラーチ)

27.5マイクロリットルの保存シランを、3275マイクロリットルのトルエン

と混合した。300マイクロリットルのこの溶液をスピニング被着法にて、さらにウェッファを120℃で60分のあいだ硬化処理した。最終被着層の厚さは、100オングストロームになることが望ましい。

### 11. PAPS (ベトラーチ)

シロキサンの1:100 (v/v) の希釈液をトルエンで生成し、200マイクロリットルのこの溶液をスピニング被着法にて、さらに使用前にウェッファを100℃で120分間のあいだ硬化処理した。最終被着層の厚さは、200オングストロームになることが望ましい。

前記の濃度、容量、重量、スピニング被着速度、緩衝剤、培養時間、および培養状態、その他すべての試験や処理方法は、本発明の好適実施例として記述されており、本発明を限定するものではない。

### 実施例6: 抗原の被着層材の比較

受容材としての抗体の単結晶シリコン基板への被着における被着層材の効率性の分析測定を行った。この方法を使えば、本発明のその他の装置を最適に利用することができる。高濃度の抗体の反応層を作成するのは、厳格な配向条件が必要で、受容材の層を作成するより難しいことが判明している。被着層の評価を行えるのが、ELISA法である。単クローン性抗西岸ワサビ過酸化酵素 (HRP) を試験受容材として被着層に添付して、その試験表面に異なるレベル値の西岸ワサビ過酸化酵素 (HRP) を製造して標準曲線を作成した。同様条件にて微細測定孔に封鎖剤としての抗体被着層処理を施した。

金試験表面を、20μg/mlの単クローン性抗HRP (シグマ化学、ミズリー州セントルイス) を含む7.4pHの0.05MのPBS溶液で25℃で16時間のあいだ抗体被着層処理した。前記の被着層処理基板は、その被着層液に浸漬させた。その過酸化酵素 (シグマ化学、ミズリー州セントルイス) の濃縮分を、37℃で30分のあいだ試験表面つまり微細測定孔と反応させてから、脱イオン水で洗浄して不要な過酸化酵素を除去した。そして試験表面上の各点からの被着物

を、停止試薬を有する被着されてない微細測定孔に移して、450nmにおける光学密度値を記録した。停止試薬を、比較基板の微細測定孔に直接添加して、同様に測定値を読み取った。

本実験例の結果は、表4に示されているとおりである。それには、試験表面のダイナミックレンジと感度 (検出限界に対する低濃度の分解能) が評価されている。制御処理を行うため、各被着層をウサギのIgGで被着して、過酸化酵素法にて検査した。その結果、ウサギのIgGで被着した被着層では、過酸化酵素の著しい相互作用は観察されなかった。同じ条件で未処理シリコン基板も試験したが、試験表面に付着した活性受容材はわずかなものであった。(前記データは、450nmでの光学密度測定に基づくものである。)

表 4

ペルオキシダーゼの濃度 (ng/ml)

試験面	0.0	15.6	31.25	62.5	125.0	250.0	500.0	10000.0
Nunc	0.005	0.634	0.645	0.883	0.876	1.252	1.561	1.413
Dynatrch	0.017	0.161	0.150	0.279	0.662	1.173	1.465	1.598
PEI/DKDCS	0.007	0.136	0.254	0.371	0.428	0.714	1.118	1.493
T-ポリマー	0.030	0.076	0.107	0.111	0.276	0.498	0.730	0.850
T-ポリマー*	0.015	0.137	0.328	0.365	0.473	0.682	0.945	0.810
MSA	0.003	0.037	0.100	0.168	0.305	0.373	0.511	0.428
PEI*	0.008	0.175	0.238	0.636	0.651	0.702	0.817	0.743
TC7*	0.016	0.065	0.109	0.159	0.179	0.399	0.324	0.215
MERCAPTO	0.000	0.259	0.514	0.668	0.881	0.557	1.143	1.558
DKDCS	0.015	0.039	0.036	0.166	0.100	0.152	0.259	0.442
ポリスチレン	0.000	0.248	0.343	0.444	0.631	0.756	0.795	0.878
BAS*	0.002	0.008	0.012	0.026	0.055	0.100	0.120	0.210
PBD	0.011	0.013	0.047	0.041	0.072	0.108	0.124	0.143
PAPS	0.004	0.314	0.559	0.513	0.790	0.822	1.259	1.186

\*T-ポリマーは最終厚み240Åまで基板に塗布した

\*T-ポリマーは最終厚み55Åまで基板に塗布した

\*TC7Aは最終厚み245Åまで塗布した

これらのメーカーから入手した微量測定ウェルを光学的試験面と比較するのに用いた

本実験例では、基板をPEIまたはBASで処理する作用における、両基板表面の被着層のシロキサンの有効性が示されている。同様に、各シロキサンの利用においての多様性があるため、シロキサンの作用基は受容材の反応特性に影響することが判る。また、分子自己結合ポリマーも、BASに対する被着層としての作用機能的増加を示しているが、シロキサン材ほど有効ではない。TC7A表面活性剤はこの測定方法ではあまり作用していないが、以下の実験例では有効性が見られる。

### 実施例7: 抗体の被着層材の比較

本分析実験では、異なる被着層を、7.4pHの0.05MのPBSのウサギのIgG (シグマ化学、ミズリー州セントルイス) の20μg/ml溶液に25℃で16時間のあいだ浸漬して被着層処理した。また、ヤギ抗 (全分子) ウサギIgG抗体というラベルの付いた異なるレベル値のHRP (シグマ化学、ミズリー州セントルイス) にて、37℃で15分のあいだ試験表面を培養した。それから、脱イオン水で洗浄して不要物を除去した。試験表面にTMB基板溶液を塗布して、25℃で2分のあいだ反応させてから、溶液を停止剤を有する被着のない微細測定孔に移した。(この実験での光学密度値は、450nmで測定されている。) その結果は、表5に示したとおりである。

表 5

ヤギ抗ウサギHRPの濃度 (ng/ml)

試験面	0.0	15.6	31.25	62.5	125.0	250.0	500.0	10000.0
PEI/DKDCS	0.010	0.035	0.085	0.123	0.290	0.289	0.469	0.572
T-ポリマー	0.015	0.060	0.061	0.138	0.424	0.437	0.585	0.715
MSA	0.073	0.019	0.033	0.085	0.153	0.227	0.616	0.799
原料シラン*	0.000	0.000	0.001	0.012	0.026	0.037	0.128	0.280

\*T-ポリマーは最終厚み53Åまで基板に塗布した

\*原料シリコンは基板材料のみを意味する

この実験例では、抗体補足の検知における装置の有効性が、様々な試験表面を使って確認されている。ここでは、シリコサン被覆層と分子自己結合被覆層のどちらとも同様に作用結果が良かった。装置層の被覆のない基板では、受容剤の有効作用つまり反応がわずかしくなく、装置層の必要性が判明した。

#### 実験例8：比較方法の形式

DNPは、小さな分子体であって、治療用品、有害薬品、殺虫薬残留物、有機残留物などのような分子範囲における特異なものではない。そのような小さな分子体を測定するために、比較形式測定法が使われている。

本実験例では、DNPの濃度の定量測定とその結果を説明している。まず試験表面を、ハプテン、または、ハプテンと結合した抗体にて被覆処理した。ハプテンは、適当な化学薬品が入手可能なら直接に試験表面に固定するか、あるいは、受動的に表面に添付するか、いずれでもかまわない。同じことが、ハプテン/抗体を利用した場合もいえる。

試験サンプルを、その中の自由ハプテンとだけでなく固定ハプテンとも反応するような物質と混合した。最も普通に使われる物質のひとつに、ハプテン特有抗体がある。抗体の代わりに、高比結合試薬を使ってもよい。そのような試薬の補正作用は、元の試験サンプル内の自由ハプテンの濃度に反比例する。本実験例は定量または定性の分析結果を作成することを目的としている。

下記のような材料と試薬とを準備した。

1. 直径が4インチで、 $n=4$ 、02、如文試験品質、片削研磨、1-0-0結晶取向の単結晶シリコンウェファを、屈折率が $2.0 (\pm 0.05)$ で最終厚さが550オングストローム ( $\pm 10$ ) の一酸化シリコンにて被覆処理した。この材料から作成された薄膜の干渉色層は金色であった。ウェファへの一酸化シリコンの被覆は、従来の化学蒸着法にて行った。
2. ウェファを、実験例1に記述してあるビスアミノシレン蒸着処理にて活性化させた。

#### 実験例9：異種分子の検知

所定波長における屈折率が4.02の4インチ単結晶シリコンのウェファを、オキシ窒化シリコンにて被覆処理した。このオキシ窒化シリコン層の屈折率は、約540オングストロームの厚さにおいて1.98であった。

次にウェファを、フォトレジスト効果を作成できる従来のウェファスピニング被覆技法を使い、50 $\pm$ 2オングストロームでいどのポリエチレニニミン (ペトラッチシステム、ペンシルバニア州プリストル) を添加して化学的活性化させた。そして、2時間 $\pm$ 0.1のあいだ14℃の炉内で、ウェファを硬化させた。

少量の分析剤、トリニトロベンゼン・スルホン酸 (TNBS)、の未使用の1%溶液を脱イオン水内に用意した。そして、25 $\mu$ lの脱イオン水 (前即用) と同量のTNBS溶液とをアミン被覆ウェファの試験表面上に吸着した。それらを、5秒間だけ試験表面と反応させてから水で洗浄して、圧縮空気で乾燥した。多色光を照射した目視検査の結果、TNBSを接触する区域は赤紫色であった。

TNBS結合に因る試験表面上での厚き変化は、ほぼ20オングストロームであった。これは、TNBS結合の区域内における可視認識可能な色変化を生じさせるには、十分な量である。

#### 実験例10：酵素検知

4インチの単結晶シリコンウェファに、525オングストローム $\pm$ 3%の窒化物のAR被覆 (屈折率1.97 $\pm$ 0.05) を作成した。

深紫色のウェファを、100 $\pm$ 2オングストロームでいどのアミノアルキル (1構造) ポリシロキサン (ペトラッチシステム、ペンシルバニア州プリストル) にて被覆処理した。そして金色のウェファを、140℃で2時間のあいだ硬化させると、ウェファにはうすい紫色が表れた。

シリコサン被覆ウェファを、酸溶解コラーゲンを含む吸収培養液内に吸着した。そのコラーゲン溶液は、以下の方で調整されたものである。まず、子午の皮からの酸溶性I型コラーゲン (シグマ化学、ミズリー州セントルイス) を、

3. そのアミン被覆処理試験表面を、ファルコン製100mm組織培養皿内の、人体血清アルブミン (HSA) と結合した5mg/mlのDNP (DNP-HSA) と7.2pHの調整緩衝液 (PBS) とを含む30ml培養液内に置いた。そして、試験表面上に40オングストロームのDNP-HSAが吸着するまで、温度98%で37℃ ( $\pm$ 2) の温度でウェファを被覆処理した。作成層の厚さの測定には、ガートナー製の精円偏光測定器を使用した。ウェファの被覆処理溶液を除去して、脱イオン水で洗浄して、真空噴流にて乾燥させた。
4. ヤギ用抗DNPをPBSと混合して、1.2mg/mlの濃度にしてから、DNPを水に溶かした。そして抗体とDNPとを、1:1の割合で混合した。続いて、その混合物の20 $\mu$ lを被覆表面に塗布して、10分のあいだ室温で培養した。脱イオン水で不要物を試験表面から洗浄除去して、真空噴流で乾燥した。スライド皿を目視検査してから、サガックス製の比較精円偏光測定器の改良型を使って光量を測定させて、試験表面の質量変化を測定した (図15参照)。その検取用プロトコルは、実験例21に記述されている。目視検査の結果、試験物を基準曲線と比較した場合の濃度の半定量値の測定評価が得られた。

その結果は、表6に記述してある。

表 6		
添加したDNPの濃度 (ng/ml)	相対エリブソメトリー強度	目視判定
0.0	53.2	++
0.031	40.4	+
0.062	34.0	+
0.125	27.4	+/-
0.500	20.8	+/-
1.000	23.3	+/-
100.0	15.0	-

5mg/mlの濃度でpH4に調整された1モル酢酸に溶かした。そして、20 $\mu$ g/mlの酸溶解コラーゲンを含んだpH6.8の0.1モル調整緩衝液 (PBS) を生成した。この溶液を使って、ウェファを室温で2時間のあいだ被覆処理した。この溶液30mlをファルコン製組織培養皿に入れて、ウェファをそれに浸漬した。その後、ウェファを水で洗浄して圧縮空気で乾燥した。ウェファの色は暗い紫褐色であった。次に、コラーゲン被覆ウェファを評価測定するために、50mMのカルシウムイオンを含むpH7.2の0.1モルTris-HCl緩衝液中のコラーゲン酵素溶液 (ボーリンジャー・マンハイム) を1mlにつき0~1作用単位で作成した。1単位とは、25℃においてFALGPAを毎分1 $\mu$ molだけ加水分解できる酵素量に等しい。本実験例では、酵素によりウェファ上のコラーゲンが劣化され、膜厚が減少した。膜厚の減少は、本発明で説明する他の実施例に対抗するものであって、その結果として色変化が起こった。

1mlにつき0.5単位の濃度のコラーゲン酵素を25 $\mu$ lだけ投与して、5分間コラーゲン被覆ウェファと反応させた。その後、ウェファを脱イオン水で洗浄して圧縮空気で乾燥した。可視検査の結果、酵素の接触する区域は金色に変化した。その周囲は暗い紫褐色のままであった。その検査結果は、表7に図示されている。

表 7		
コラーゲナーゼの濃度	目視判定	色
0.0 $\mu$ /ml	-	パープル/ブルー
0.1 $\mu$ /ml	+	パープル
0.2 $\mu$ /ml	+	パープル
0.5 $\mu$ /ml	++	うすいパープル
0.8 $\mu$ /ml	++	うすいパープル
1 $\mu$ /ml	+++	ゴールド

**実施例11: 被覆層の評価**

シリコン基板は、ラップ処理などの当業者には周知の作成方法により単結晶シリコンのインゴットからウェファをダイヤモンド刃で切り出して作成した。切り出したウェファに、研磨材によるラップ処理、均一平坦面作成のための酸またはその他腐食液を使ったエッチング処理、および、さらに微細表面粗さ仕上げのためのラップ処理を施した。この実施例では、平均が1.5ミクロンであるような1.2〜2.1ミクロンの酸化アルミニウムの粉末の研磨剤を使って、拡散性反射表面を作成した。また、この実施例では、上記の方法で作成された基板上に、550オングストロームの厚さの酸化シリコンの被膜を形成した。前記の材料の組合せは自由であって、本発明におけるAR材の厚さを変更しても構わない。そして試験表面に、実施例5に記述されているように複数の緩衝層を形成させた。

前記の試験表面を、pH 6.5の0.1MのHEPES内のウサギA型抗連鎖球菌抗体（ストレプA）の抗体の20 $\mu$ g/ml溶液にて25℃で60分のあいだ被覆処理した。そして、試験表面を、ラテックス質量増加試薬（実施例14参照）と同じストレプA抗原を含む、あるいは、含まない10マイクロリッタの制御溶液に入れて、室温で2分のあいだ培養させて反応をみた。試験表面を脱イオン水で洗浄してから、真空乾燥で乾燥させた。

1部の2MのNaNO<sub>3</sub>の1部の2Mの酢酸を混ぜて、0.68NのNaOHで中性化して陰性制御剤を作成した。陰性制御剤は、市販されている培養ストレプA細胞から抽出された沈降の細胞調整剤を使い、使用前に抽出媒体液で希釈した。試験表面に添付する前に、サンプルを2次ラテックス試薬と1:2の割合で混合した。その結果は表8に記載されており、陰性制御剤上で可視化可能な陰性制御剤の高度希釈液としての特徴が見られる。

**表 9**

試験面	負の制御 (aV)	正の制御 (aV)
PEI	38.0	133.0
PBD	21.2	37.7
TC7A	0.0	58.0
T-ポリマー	15.5	286.4
MSA	0.0	136.0

試験した緩衝層はすべて、PEI、MSA、T-ポリマーにての実験例法の有効性を示し、最終結果を生み出した。

**実施例13: コラゲナーゼ活動**

実施例5のような方法でTC7A試験表面を作成して、単結晶シリコンウェファを直接被覆処理した。その試験表面を、4.9 $\mu$ g/mlの1型人体コラゲナーゼを含むpH 9.0の0.1MのTris-HCl溶液（シグマ化学、ミズリー州セントルイス）内に浸漬した。試験表面は、25℃で60分のあいだ被覆処理された。そして、脱イオン水で表面を洗浄して、使用前に真空乾燥で乾燥した。その結果、不活化コラゲナーゼの143オングストローム層が作成された。0.005MのCaCl<sub>2</sub>とpH 7.6の0.1MのTris-HClとを含んだ緩衝剤で、コラゲナーゼ（ボリンジャー・マンハイム、インディアナ州インディアナポリス）の異なる割合の希釈液を調整した。コラゲナーゼの希釈液を5マイクロリッタ、それぞれ試験表面に点滴して室温で5分のあいだ培養させた。反応試験表面を脱イオン水で洗浄して、真空乾燥で乾燥した。その反応試験表面をサガックス製の比較用内照光測定器で調べて、反射光の強度を記録した。本実施例では、受容材の層がコラゲナーゼにて劣化され、コラゲナーゼの活動や濃度を増加させるような作用を示す陰性信号である孔が受容材に形成された。コラゲナーゼの活動は、10<sup>-5</sup>/mlの単位で記録されている。活動測定的光強度の単位はミリボルトである。（表10参照）

**表 8**

試験面	最高に検出可能な希釈率
T-ポリマー	1:256
TC7A	1:8
BAS	目視反応なし
PEI	目視反応なし
PEI/DDCS	1:16
DPhOS	目視反応なし
MSA	1:64

本実施例では、結果が拡散反射基板上の可視信号として示される被覆層の形成方法における緩衝層の有効性が判明した。BASやPEIの場合、作用上の受容材結合はあまり見られなかった。個々のシロキサンでは、受容材に付着する様々な能力を示した。最高反応結果を示したのは、T-ポリマーシロキサンであった。分子自己結合緩衝層とTC7Aの表面活性剤のどちらも、やはり本方法の実験例法においての有効性をもっている。

**実施例12: 材料利用**

この実施例での単結晶シリコン基板は、研磨表面をもつウェファである。緩衝層を実施例5と同じように処理してから、実施例11のように、抗体を付着させた。この評価測定も、実施例11と同じである。使用した陰性制御剤は、Aストレプ抗原の希釈液を含んでいる。乾燥させた後、反応試験表面をサガックス製の比較用内照光測定器で調べて、反射光の強度を分光分析器をミリボルト単位の数値で記録した。（表9参照）。

単位はミリボルトである。（表10参照）

**表 10**

コラゲナーゼ	試験#1	試験#2	試験#3	平均値	S.D.	%CV
0.0	-15	-1	2	-4.7	9.0	200.0
100.0	60	55	68	61.0	9.6	10.8
200.0	125	93	108	108.7	18.0	14.7
300.0	181	118	188	162.3	38.6	23.4
500.0	271	228	228	240.0	27.1	11.3

本実施例では、酵素活動を検出できる試験表面の作成例が示されている。この場合、その活動状況は低下しているが、合成的活動の観点からの酵素活動を測定できる構成の存在が確認できる。この実施例では、TC7A緩衝層におけるT-ポリマーシロキサンに対する受容材の受容度合は、3倍ほど増加していることが判る（ただし、結果は図示されていない）。

**実施例14: 質量増大**

本実施例では、質量ラベル付け抗体の使用と質量作成試薬の選定について説明している。本発明の他の構成においての最適質量ラベル決定の際にも、前記の選択方法利用できる。

そのような表面活性剤粒子は、インディアナ州カルメルのバング研究所の、アミド粒子、ロット番号L910108（SA-015/758）やロット番号901015（B7-015FF/181）、カルボキシル酸塩粒子、ロット番号9004108（B7-015FF/787）などが入手できる。その他、インディアナ州インディアナポリスのセラディン社のTC3、TC3X、TC7、TC7Xのフィルム形成粒子も同様に適用できる。それらTC型の薬剤はすべて、ステレン-ブタジエン-コポリマーを含むカルボキシル酸である。これら薬剤の

うちTC7だけを、特に詳しく調べた。TC3は、タンパク色フィルムを形成するので使用しなかった。検査したセラディン社の粒子材は、TC-7A、製品番号CML、ロット番号1K30、TC-7X、ロット番号1M92、TC-7、ロット番号1V18 (F040690)、TC-3X、ロット番号1R35、TC-3、ロット番号1J44である。表面活性剤処理の結果、カルボキシル基とアミドの両方の粒子が存在するため、化学的不動状態がよりフレキシブルになった。米国特許第4,421,896号に記載されているように、アミノ粒子は簡単にヒドラジド粒子に変換できる。

この実験例では、単結晶シリコンの超平坦ウェファを直接に使用した。それらウェファには、スピン被膜装置を使って保存シロキサンの2メチル2ブタノールでの1:300 (v/v) 希釈液300マイクロリットルを添加して、Tポリマーシロキサン (ペトラーチ・システム、ペンシルバニア州プリストル、カタログ番号PS401) の被膜処理をした。そしてTポリマーを、120℃で120分のあいだ熱処理して硬化させて、ウェファ試験表面を形成した。活性化させた基板を、pH6.0の0.1MのHEPES緩衝液内の、A型濾膜表面に対するウサギポリクロニン抗体が20マイクログラム/ml含まれた溶液に浸漬した。そして、そのウェファを25℃で60分のあいだ前記抗体溶液に浸した後、脱イオン水で洗浄して重蒸留液で乾燥させた。サガックス製の比較板内偏光測定器にて反応ウェファを検査したら、層厚つまり光学濃度の変化が確認された。

前記のさまざまな被膜をもつフィルム形成粒子材の検査結果が、表11に示されている。表11では、抗体濃縮、粒子濃縮、必要に応じたブロック剤の添加を説明している。フィルム形成粒子を被膜処理するのに使われた抗体は、偏光偏光測定ウェファ上の受容材に使われたものと同じである。粒子材表面への抗体の被膜処理は、25℃で16時間のあいだ混合物を培養することにより行った。TC7材を、保存液の希釈液として準備し、水に対して透析して、抗体との反応作用前に混合ベッドレジンで処理した。

SA:COOH-界面活性剤 1	150	1:10	-	85	90
SA:COOH-界面活性剤 20	370	1:1	-	283	150
SA:COOH-界面活性剤 20	370	1:4	-	280	231
SA:COOH-界面活性剤 20	370	1:1	1:1 1%	213	133
BSA					
SA:COOH-界面活性剤 5	150	1:1	-	117	91
SA:H-N/Clut H <sub>2</sub> O 4	150	1:1	-	55	101
SA:H-NH 10	150	1:4	-	281	135
SA:H-NH 10	150	1:10	-	242	111
SA:H-NH Bicine 3	150	1:1	-	19	25
SA:H-NH H <sub>2</sub> O 4	150	1:2	-	41	63
SA:H-NH H <sub>2</sub> O 10	150	1:1	-	125	217
SA:CONH <sub>2</sub> 3	150	1:4	-	66	55
SA:CONH <sub>2</sub> 10	150	1:4	-	66	63
SA:H-NH* 3	300	1:2	-	0	613
SA:CONH <sub>2</sub> * 3	300	1:2	-	0	320

・アンブリファイト：試料の比率

この粒子製剤中のヒドラジドの最終濃度は3Mであった。そして抗体はその粒子に50mM BES (pH=8.0) 中30分間に56℃

最終濃度1% (v/v) のカルボジイミド (1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド) ノート-p-トルエンソルホネート (Aldrich Chemical, C. o. Milwaukee, WI, カタログ No. C10, 640-2、ロット No. 09915PW) を加えることにより、抗体の共有結合形成をカルボキシレート粒子に関して検討した。抗体を添加する前にカルボジイミドを加えた。抗体を加える直前にヒドラジド処理したアミド粒子を最終濃度0.05%のグルタルアルデヒドで処理して、粒子表面への抗体の共有結合形成を導くこともできる。特に記載がない

表 11

7279717	固形分%	抗体の濃度	A:S . 比率	Force	数値
食 正					
TC7	3	150	1:1	-	45 60
TC7 (透析)	3	115	1:1	-	45 45
TC7	3	7.7	1:1	-	98 110
TC7 (117交換)	3	115	1:1	-	43 50
TC7	3	150	1:1	0.005M	83 60
SDS					
SA:COOH	3	150	1:1	-	145 181
SA:COOH	3	150	1:1	-	143 180
SA:COOH	1	150	1:1	-	74 80
SA:COOH	3	150	1:1	0.01%	50 50
1.515 μg/ml					
SA:COOH	3	7.7	1:1	-	132 150
SA:COOH	1	7.7	1:1	-	87 97
SA:COOH	3	150	2:1	-	122 147
SA:COOH	3	150	1:4	-	42 51
SA:COOH	2	150	1:1	-	47 58
SA:COOH	2	150	1:4	-	55 61
SA:COOH	2	150	1:2	-	34 68
SA:COOH/H <sub>2</sub> O	7	150	1:1	-	56 60
SA:COOH/H <sub>2</sub> O	7	200	1:1	-	56 63
SA:COOH/EDC/H <sub>2</sub> O	7	150	1:1	-	38 42
SA:COOH/EDC/H <sub>2</sub> O	7	200	1:4	-	48 51
SA:COOH-界面活性剤 1	150	1:1	-	122	82

い限り、pH7.2の0.01Mリン酸緩衝生理食塩水中において粒子を抗体で被覆した。

陽性対照の作製のために使用したストレプトA抗体試料は市販のものであった。この抗体を2M NaNO<sub>3</sub>、2M酢酸、0.66N NaOHの1:1:1混合物中で1:600の希釈レベルまで希釈した。同じ試料の抗体を含まないものを陰性対照として用いた。増幅試薬を表11に示したような様々な比率で陽性および陰性対照と混合し、5μlを抗体被覆したオブラートの表面に塗布した。サンプルを25℃で2分間インキュベートして洗浄し、その装置を流水で乾燥させた。反応させたオブラートを修正Sagax Ellipsometerで検査し、その厚さをミリボルトで測定した強度の変化として記録した。

これらのデータは、増幅試薬中の極めて高い粒子密度はその試薬と被膜表面との非特異的結合を導くことを示している。補助たんばくあるいは界面活性剤を加えても抗体被覆した粒子の成績は改善されない。表面活性剤よりもわずかに硬性であるTC-7粒子も同様にこの特定適用に関して作用しないが、他のいくつかのラテックス製剤に比べると、TC-7粒子は有意な反応性を示す。温度上昇は粒子への抗体の取り込みのレベルを改善する、従って遊離抗体のレベルを低下させると思われる。これらの粒子から遊離抗体は取り除かれなかったが、例外通過のような技法によって非結合抗体を除去することは有用であると考えられる。アミド粒子も良好に作用するが、ヒドラジド誘導アミド粒子は最高の全体的反応性を与えると思われる。表面活性剤であるカルボキシレート粒子はアミド粒子ほどには働かない。

#### 実験例15：ラテックス

この試験では、増幅フィルム形成粒子を実験例14におけると同様にして調製し、実験例14と同様にして検定を行なった。使用した高質は、12~20ミクロン (平均粒子サイズ15ミクロン) の酸化アルミニウム粒子で被覆して、半導体産業の当業者には周知の工程を用いて植付造の表面を創造した。半導体検査

特表平7-509565 (31)

オブラートであった。この基質を窒化珪素の薄層で被覆した。350~550Åの窒化珪素フィルムはこの適用のための標準品であるが、どのような厚さのフィルムも使用可能である。光学的スライドガラスのTポリマー処理は実施例5および14の中で述べた。

結果を表12に示す。視覚的結果は精円体測定システムで行なった結果とは異なっている。非常に高い粒子密度は明らかな陰性結果をもたらすが、強い陽性の視覚的シグナルは生じない。粒子に取り込まれたより高濃度の抗体は、機器を用いた検定で認められるように、より低レベルの抗体よりも強いシグナルを生じる。この試験は、粒子の抗体被覆が不十分であると、ラテックス粒子と被覆表面との非特異的結合が生じることを示唆している。ひとたび抗体被覆が十分になると、しかしながら、陽性および陰性の結果は容易に検出可能且つ識別可能となる。

表 12

増幅剤	固体%	抗体濃度	A:S比	視覚反応	
				陰性	陽性
SA:N-NH <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	10	150	1:1	-	+
SA:N-NH <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	10	150	1:1	-	+
SA:N-NH <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	10	150	1:2	-	+
SA:N-NH <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	10	150	1:3	-	+
SA:N-NH <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	10	150	1:4	-	++
SA:N-NH <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	10	150	1:5	-	+/-
SA:N-NH <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	3	150	1:1	+/-	++
SA:N-NH <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	3	150	1:5	+/-	+
SA:N-NH <sub>2</sub> *	3	300	1:2	-	+++
SA:CONH <sub>2</sub> *	3	300	1:2	-	++

。増幅剤対サンプルの比率

ている)をオブラートの同じ部分に適用し、5分間そのまま放置した。オブラートを洗浄し、乾燥させた。反応が起こった部分では黄色の斑点が見えた。その後、この生じた沈降物を肉眼で目視検査で検取り、顕微鏡の存在を確認した。抗体の1:20,000の希釈溶液は肉眼で陰性の結果から明確に検出される(図13参照)。

表 13

顕微鏡の結果

希釈倍率	肉眼観察	顕微鏡検査でのミリボルト
0	-	64.2
1:10,000	+	162.0
1:5,000	+++	238.5
1:2,500	+++	395.7
1:1,000	++++	635.0

。抗体原液試料の50% MOPS中への希釈。

上記の検定に基づき試験キットが作製できる。このキットは50回までの光学的迅速免疫測定法を実施するために必要なすべての成分を含んでいる。キットは、必要とされる適切な洗浄と乾燥のステップを容易にできるようにデザインされた固体支持試験点を含み、対象とする検査分析物に特異的な1~5(またはそれ以上)の非反応性試験表面を含むスライドガラスを試験点上に置く。最初の反応が終わると、スライドは操作者から離れて前方に傾く。試験表面は洗浄液で力強く洗浄され、その洗浄液は傾いた表面から下の貯水槽内に流れ込む。(貯水槽は検定前に処理された酢酸セルロースの固体吸収体を含む)。スライドはその水平位置に戻り、1枚の吸収紙が試験表面上に直接置かれる。数秒間の接触時間によって十分な吸収が可能になる。吸収紙は、試験キットの前面に便利に位置する個々の切り出し紙のパッドとして供給されるが、洗浄/乾燥工程は

。最終ヒドロリド濃度は3Mで、50mM MOPS、pH=6.0中、55℃で30分間抗体を粒子に付加する。これらの実験において最終 pH を8.0にするため2.5M MOPSを中和剤として使用した。

実施例15: 陽性増幅

ホースラディッシュペルオキシダーゼ(Sigma グレードVI)を、顕微鏡用A、C、Y、W<sub>111</sub>の培養物からの細胞懸濁液をあらかじめ注射しておいたウサギの肝臓高力価血清からのカプリル酸沈降反応によって精製した免疫グロブリンに化学的に結合した。結合は、試薬S-アセチルチオ酢酸N-ヒドロキシルスクニミドを使用し、Analytical Biochemistry 132 (1983) 68-73に述べられている方法に従って行なった。結果として生じた複合体は、MOPS緩衝液、50mM、pH 7.0中でペルオキシダーゼ(104μM)と免疫グロブリン(35μM)を含んでいた。ペルオキシダーゼ-免疫グロブリン複合体をカゼイン(5mg/ml)と共にMOPS緩衝液中で希釈し、等量の顕微鏡培養物からの細胞不溶解物の希釈液と混合した。

試薬混合物(25μl)を、窒化珪素、Tポリマー-シロキサンおよび同じ顕微鏡用に対するウサギ抗体試料からの精製免疫グロブリンの層で被覆した珪素オブラートの表面にビベットで滴下した。抗体を、50mM MOPS、pH 7.0中10μg/mlの抗体を含む溶液から、Tポリマー/珪素オブラートに被覆した。オブラートを室温で1時間抗体中に放置し、脱イオン水で洗浄して、室温下で乾燥させた。抗体被覆した基質を、室温で1時間、50mM MOPS、pH 7.0中0.5mg/mlの加水分解したカゼインと共にインキュベートし、その後洗浄して乾燥させた。

サンプルを1:1の割合で複合体と混合した。10μlを被覆表面に塗布した。2分後、サンプルを水で洗い流し、オブラートを室温下で乾燥させるか、もしくは凍結状態で取り出した。TMブルー-沈降試薬(TMブルーは市販の製品で、Transgenic Sciences, Inc.の商標であり、米国特許5,013,648に開示され

毛細管作用のようなその他の手段によって実現することもできる。さらに、酵素標識物質、すなわち対象とする分析物(抗原など)に特異的な酵素標識抗体が、適切に選択され、希釈されて供給される。最後に、市販のTMブルー-沈降試薬のような沈降手段が、1~3滴またはそれ以上が1滴ずつ滴下されて陽性的にもたらされる質量変化を引き起こし、洗浄前に沈降反応を生じさせることができるように、組合のよい容量で供給される。該表面に基質を添加することにより第2のインキュベーションが開始され、洗浄/乾燥工程が繰り返されて試験が完了する。2つの異なるタイプの珪素オブラートを使用した: 1つは金色の窒化珪素で被覆したオブラートであり、もう1つは窒化物被覆なしの銀色の珪素オブラートであった。1つの可能性は、窒化珪素上のペルオキシダーゼ/沈降基質系に関して認められた可視色が、厳密に表面上に沈降した染料の吸光度によるものであるということである。この場合に相当し、且つ沈降した染料が層として働かなければ、銀色の珪素オブラートはTMブルーのみの深青色の視覚的シグナルを生じさせることになる。

Tポリマー被覆したオブラートを5つの別個の試験のために抗体で処理した: 顕微鏡用A、C、Y、W<sub>111</sub>; 顕微鏡用B; 連続培養B; インフルエンザB; 肺炎球菌培養。各々の試験のために作製した最初の試薬は、先に述べたように付着層(Tポリマー-シロキサン)で被覆した金色と銀色のオブラートであった。オブラートを適切な溶液中に室温で1時間浸漬して、5個の抗体全部を50mM MOPS、pH 7.0中10μg/mlの抗体濃度でこれらのタイプのオブラートに被覆した。実施例1に述べたようにしてオブラートを洗浄し、乾燥させ、ブロックした。

必要な第2の試薬は、上に述べた方法を用いて抗体・ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合物を作製するため、同じ5個の抗体試料を使用した。複合体の原液試料を用いて、5mg/mlのカゼインを含む50mM MOPS、pH 7.0中で最終的な複合体比率1:100に希釈することにより作業用複合体を作製した。作業用複合体溶液を標準沈降試料と1:1の割合で混合し、20μlサンプルを適

特表平7-509565 (82)

OIAとラテックス凝集との感受性比較

微生物	抗原のソース	ラテックス1+		OIA*	
		反応*	4K	20K	5
結核菌	細胞上清液				
A. C. Y. Weiss					
結核菌B	脳脊髄液に希釈したキット陽性	8		32	4
	硬膜液に希釈したキット陽性	20		160	8
	細胞上清液	25K		200K	8
インフルエンザウイルス	キット陽性	10		80	8
連鎖球菌B	キット陽性	10		50	5
	細胞培養液のプロナーゼ抽出物	10K		40K	4
肺炎連鎖球菌	キット陽性	100		陰性	—
	4型多糖類	200		400	2
	9型多糖類	50		50	1
	12型多糖類	50		10	0.2
連鎖球菌A	陽性抗原	80		1600	20

\* ラテックス凝集検定：市販品

\* 質量増大触媒

ラテックス凝集と比較してOIAによって達成される感受性の相対的上昇を示す。

注：

1) OIAについては、希釈液は可視の陽性結果を生じる最終的希釈液である。

2) ここに示す細胞上清液は、0.5%ホルマリンの生理食塩水中で作製した菌細胞懸濁液を+4℃で1晩放置した後取り出した上清液である。これは高い含

量な抗体被覆オブラートに塗布した。

2分間のインキュベーション、次いで洗浄と乾燥、その後オブラート表面上に産物を形成させるために5分間の基質インキュベーションを用いて迅速なプロトコールを実施した。洗浄と吸収乾燥後、サンプルを顕微鏡と偏光顕微鏡で読み取った。肉眼で著明に見える黄色の斑点が黄色の置換色素被覆したオブラート上に発現し、置換色素被覆していない白色のオブラートで灰色の斑点を認めた。置換色素被覆した表面上では、非常に強い陽性が白色の干渉色を生じさせた。厚さの上昇は偏光顕微鏡を用いて直ちに測定することができた。すべての場合に白色オブラート上に発現した可視色は、沈殿した産物が真の薄層として働き、AR被覆なしでも干渉効果を生じさせることを示している。発現する色は染料の吸光度特性には依存しない。

色素原が認められる可視反応の産生に寄与しないことのさらなる証拠が次の実験によって得られた。TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産物を反応停止試薬、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で処理すると黄色の沈殿物が生じる。ここで検出している光学的支持体に関して観察される可視反応が単に色素原のみによるものであれば、表面の沈殿物を反応停止試薬で処理すれば黄色の斑点が生じるはずである。固定化した表面沈殿物を硫酸で処理しても、置換色素被覆したオブラート上に生じる強い黄色あるいは青色の斑点には変化を及ぼさない。従って、生じるシグナルは全面的に薄層の形成に依存する。置換色素の表面から沈殿物を取り除く接着剤の細片を用いて追加的な確認が得られた。接着剤で除去した沈殿物は、赤色成分を含まない灰色/青色であった。認められる干渉効果は、強い赤色成分を伴う明黄色/青色を呈する。このことは、薄層形成が認められる黄色作用産生の原因であることを裏付けている。

表14は、細菌抗原検定の全範囲について、質量増大検定と Tellico Diagnostics が製造しているラテックス凝集検定との比較から得られた結果を示している。

表 14

量の多量類を含み、従ってかなりの希釈を必要とする。

3) ラテックス試験は、使用期限の来っていない市販の製品に関して実施した。

表15aと15bに示した結果は、触媒性質量増大法と酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)との比較である。データは、TMBを基質として使用し、結核菌A. C. Y. Weissに関してELISAに比べ酵素増大検定法の高い効率を示している。ELISAの試験表面と光学試験表面の作製を以下に述べる。

これらの技法には2つの大きな違いがある。まず第一に、本発明の方法が抗体の固相吸着のために研磨した酵素オブラートを使用するのに対し、ELISAは透明なポリスチレンのマイクロタイタープレートを用いる。第二に、そしてより重要な相違として、この触媒法の場合には、反応を促進させるために使用する基質は研磨酵素オブラートの表面に沈着する不溶性産物を生じるが、ELISAの基質はマイクロタイタープレートのウェル中に着色した溶液を生じる。この触媒法によって得られる結果の感受性がより高いのは、この重要な相違のためである。ELISAが色素原から生じる可視色に依存するのに対し、本発明の装置は被覆上に沈着する色素原の薄層にのみ依存する。

詳しく述べると、一方の表面は研磨した酵素オブラート(OIA)であり、他方の表面は透明ポリスチレンのマイクロタイタープレート(ELISA)である。両方の表面に10μg/mlの抗体溶液を室温で1時間適用し、脱イオン化水で洗浄して、0.5mg/mlのカゼイン阻止溶液を室温で10分間適用し、最後に脱イオン化水で洗浄する。

検定において、抗原の希釈は次の通りであった：1:5,000; 1:10,000; 1:20,000; 1:40,000; 1:80,000; 1:160,000; また複合体溶液は、5mg/mlのカゼインと50mM MOPS O、pH 7.0を含むHRP標識抗体の1:100希釈溶液であった。使用の直前に各々の抗原希釈溶液を複合体溶液と1:1の割合で混合し、各表面に適用した。これを室温で2分間反応させ、次に各表面を脱イオン化水で洗浄した。その後各表面に基質を添

加した。酵素オブラートにTMBブルー、ELISAプレートにTMBを添加した。これを室温で5分間反応させた。この時点で反応を停止させ、酵素オブラートを脱イオン化水で洗浄し、室温で乾燥させた。ELISAはH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で停止させた。視覚的検取を行なって、陰性と陽性しうる最小抗原希釈を判定し、表面上に沈着した不溶性産物を含む試験表面を偏光顕微鏡に入れてそれぞれの電圧量を測定した。1:10,000~1:20,000の希釈までしか検取できなかったELISA(停止せず)に比べ、OIAは1:40,000の抗原希釈検定まで検取することができた。一方ELISA(停止)は肉眼で1:5,000~1:10,000希釈までしか検取できなかった。機器を用いた検取の結果を表15aと15bに示す。

表15a  
触媒性質量増大法(OIA)の結果

OBS*	抗原希釈倍率	強度の変化
2	0.000	0.006
2	5.000	0.339
2	10.000	0.154
2	20.000	0.059
2	40.000	0.023
2	80.000	0.013
2	160.000	0.011

\* 真施した酵素反応

強度の変化は、真施の強度から比較偏光顕微鏡で記録された背景強度を差し引いたものである。



表 15b

## ELISAの結果

希釈	450 nmでの光学密度の読取り			
	1	2	3	4
0	0	0.013	0.003	-
1:160,000	0	0	0.008	0.015
1:80,000	0.006	0.036	0.037	0.045
1:40,000	0.006	0.005	0.027	0.001
1:20,000	0.015	0.012	0.012	0.041
1:10,000	0.030	0.043	0.068	0.053
1:5,000	0.081	0.085	0.097	0.123
1:5,000	0.063	0.064	0.094	0.088

## 実施例17:ラテックスと触媒性増大剤

酵素標識検定を用いて連鎖球菌から抗原を検出し、アミド酸性表面活性剤ラテックス、0.161  $\mu\text{m}$  (Rhône-Poulenc) を使用した検定と同じ検査オペラートに関して比較した。

いずれの技法も、抗原の1:80希釈を限界とする市販 (Wellcome Diagnostica) のラテックス凝集技法よりは感受性が高い。2つの技法の感度検出率の比較を以下の表16に示す。ここに示したミリポルト読取りは、藤正Sagax Comparison Ellipsometerで記録された光の強さの感度の関数である。

グナルと同等であった。

## 実施例19:ストレプA検定装置

図8A~8Gに示した装置の作製の詳細をここで述べる。直径100mm、一方の側を研磨した20ミル±2ミルの単結晶性硫酸オペラートを半導体供給業者から購入した。オペラートを、上に述べた工程を用いて495  $\pm$  15  $\mu\text{m}$  の酸化珪素または二酸化チタンで被覆した。各々のオペラートに、0.75  $\text{cm}^2$  切片のパターンを作りながら3.5ミルの厚さまで切り目を入れた。これによってオペラートはその後のプロセスの間も無損のままとなる。次にオペラートを実施例5で述べたようにTボリマシロキサンで被覆した。最終的なポリマーの厚さ100  $\pm$  5  $\mu\text{m}$  を使用する。ポリマー被覆したオペラートを145  $\pm$  5  $^{\circ}\text{C}$  で24  $\pm$  2時間保存する。

ポリマー被覆したオペラートを、0.1M HEPES (N-(2-ヒドロキシエチル) ピペラジン-N'-[2-エタンスルホン酸])、pH 8.0中5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の酸和性糖質ワザグストレプA抗体を含む溶液中に浸した。オペラートを2  $^{\circ}\text{C}$  ~8  $^{\circ}\text{C}$  で16~20時間、抗体溶液により被覆した。オペラートを脱イオン化水で洗浄し、その後重蒸留水で乾燥させた工程上の対照を、x、y 偏光検出率を用いてそれぞれの0.75  $\text{cm}^2$  の中心に適用した。1~2  $\mu\text{l}$  の斑点を適用し、室温 (20  $^{\circ}\text{C}$ ) で3分間インキュベートした。使用した抗原の濃度は、中間的な色の感化を生じるように経験的に決定した。抗原を脱イオン化水中に混合した。抗原溶液を脱イオン化水で表面から洗い流し、その後重蒸留水で乾燥させた。次にオペラートを、50  $\mu\text{M}$  MOPS (3-[N-メルホリノ] プロパンスルホン酸)、pH 7.0中0.5%の分解したゼラチンを含む溶液中に室温で20分間浸した。オペラートを溶液から取り出し、重蒸留水で乾燥させた。ゼラチン層は抗体被覆を安定化させる役割を果たし、装置の保存を助ける。オペラートは紫色である。オペラートを30秒間真空中に接触させてゼラチン層を十分に水化させた。次にオペラートを空気乾燥させた。オペラートはもとの金色に戻るはずである。その後

表 16

抗原希釈倍数	ミリポルト/ラテックス	ミリポルト/酵素
0	3.0	11.0
1:320	32.0	203.0
1:160	63.0	290.0
1:80	113.0	272.0
1:40	195.0	194.0
1:20	316.0	168.0
1:10	428.0	258.0

## 実施例18:複数分析物プロトコール

試験表面と複合抗体試料を、次の微生物のそれぞれについて実施例16で述べたように作製した: 髄膜炎菌、インフルエンザB群、肺炎連鎖球菌、連鎖球菌B群、大腸菌K1。試験装置をこれら5つの試験表面を収容するようにデザインし、試験表面を装置内の高くなった台座の上にのせた (図9および11参照)。次の微生物のそれぞれについて一定量の各複合抗体試料を調製した: 髄膜炎菌、インフルエンザB群、肺炎連鎖球菌、連鎖球菌B群、大腸菌K1。

等量 (75  $\mu\text{l}$ ) の緩衝液 (CSF) サンプルとこの複合抗体試料を混合し、5つの抗体被覆した試験表面のそれぞれにピペットで1滴 (25  $\mu\text{l}$ ) 滴下した。CSFサンプルは、実施例16で述べたように、試験微生物から誘導した抗原の既知レベルおよび既知の組合せに関して調製した。サンプルを2分間インキュベートし、その後試験オペラートを脱イオン化水で洗浄して吸取り乾燥させた。基質 (TMB沈降反応試薬) を各表面に添加して、5分間インキュベートした。オペラートを脱イオン化水で洗浄し、吸取り乾燥して、読取りを行なった。このように、1またはそれ以上の分析物が存在する場合でも単一サンプルが容易に分析できた。この複数分析的試験は単一特異的試薬に関して認められる特異性を保持していた。偽陽性反応は認めず、また陽性反応は単一特異的試験工程で生じるシ

オペラートを各0.75  $\text{cm}^2$  の試験片に解体した。

図8A~8Gを参照すると、成形した試験装置はあらかじめ切出した吸収パッドが底に置かれており、その保護カバーがしっかりとはめ込まれている。装置の蓋には吸取り材料が上部に積層されており、保護カバーがきっちりとはまっている。装置の中心の高くなった台座に少量のエポキシを適用し、試験表面を適用する。接着剤を固まらせ、その後装置を削じてキャットに入れる。

表面を被覆するのに使用した抗体試料あるいは別個の抗体試料を、ナカネが述べている標準的ヨウ素酸化学作用を用いてHRPに結合した。質量増大試薬において使用する結合抗体の正確な希釈は、HRPの取り込みのレベルならびに使用する抗体試料の酸和性と抗体結合力に依存する。複合抗体試料を、50  $\mu\text{M}$  MOPS (3-[N-メルホリノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸)、pH 7.0、標準アルカリ処理カゼイン20  $\text{mg}/\text{ml}$ 、0.3% (v/v) トゥイーン20、および0.5% (v/v) ブロクリン300 (Rohm and Haas) を含む中で希釈した。複合抗体試料を Theatlon Natural のポリエチレン点鎖びんに入れた。供給される滴の大きさは約30  $\mu\text{l}$  であった。他のすべての試薬も同様に Theatlon Natural点鎖びんに入れた。

2.3M  $\text{NaNO}_3$  と0.01%イソプロパノールを含む溶液100  $\mu\text{l}$  をポリエチレンチューブに入れ、溶液をチューブ上で乾燥させることにより、抽出チューブを作製した。これは乾燥空気の下に室温で、または45  $^{\circ}\text{C}$  で乾燥させることにより達成される。

試薬の組成は次の通りであった:

- 試薬 No. 1: 0.25M酢酸と0.035  $\text{mg}/\text{l}$  のブロムクレゾールグリーン  
 試薬 No. 2: 1.5M MOPS, pH=7.3と0.2% (v/v) トゥイーン20、0.5% (v/v) ブロクリン300および20  $\mu\text{M}$  EDTA  
 試薬 No. 3: 複合体  
 試薬 No. 4: 0.1%ブロクリン300を含む脱イオン化水  
 試薬 No. 5: 沈降反応TMBの市販製品

この装置の使用のための試験工程は次の通りであった：

1. 試薬を低温保存から取り出し、室温に置まるまで放置する。
2. キットから乾燥試薬を含む抽出チューブを取り出し、それをラックまたはホルダーに垂直に立てる。
3. 抽出チューブおよび試験装置に適切な患者情報のラベルを貼付する。検定を実施している間は試験装置を水平な表面上に置く。
4. 試薬1を3滴抽出チューブ内に添加し、静かに振盪して底にある乾燥試薬を溶解させる。溶解し、適切に混合した時には液体は淡緑色になるはずである。血液の混じった標本の場合には抽出チューブの色の変化が明日でないこともあるが、検定の成績には影響を及ぼさない。
5. 1分以内に、標本または陽性対照を含む管口スワブをチューブ内に入れる。液体がファイバースワブから中に移動していくように、スワブを回しながらチューブの側面にスワブを押しつける。スワブを抽出液中で2分間以上インキュベートさせる。
6. スワブの柄を側面に保持し、試験2を3滴直接抽出チューブに加える。溶液の色が緑色から青色に変わるまで、スワブを使って試薬と抽出物を混合する。
7. スワブを引き出す時、チューブの側面を押しながら抽出チューブの壁にスワブを押し当てて回すことにより、スワブから抽出液を分離する。スワブを廃棄し、チューブの内容物を取っておく。スワブからできるだけ多くの液体から取っておくようにする。
8. 試薬3を1滴抽出物に加え、十分に混合する。30分間以上放置してはならない。
9. 清潔なピペットを使って該溶液1滴を対応する試験装置の表面の中心上に直接移す。試験装置の表面全体をおおってはいならない。
10. 試験装置上の滴を2～5分間インキュベートする。
11. 1～2秒間力強く洗浄することが重要である。装置の周囲の吸収性物質の容量を越えないように注意しながら、試験4の洗浄液を使って装置の表面を洗い

度す。

12. 吸取り装置が No. 1 の位置にあることを確認する。少しの間装置の蓋を閉じ、残存する空気表面から除去する。吸取りのために清潔な表面で吸取ることが必要である。初めて吸取りを行う時には、吸取り針は1の位置にあるはずである。11の位置にあれば、2回目の吸取りのために1の位置まで動かす。同じ位置で吸取りを反復することは試験結果を損なう可能性がある。
13. 蓋を開き、試薬5を1滴直接試験装置の表面の中心に適用し、4～10分間インキュベートする。最初の滴下が直接装置の中心上に行われなかった場合には、試薬5の滴を最初の滴下部分に直接移動させる。
14. 試験4の洗浄液を用いて1～2秒間装置の表面を力強く洗います。
15. 吸取り針を装置の上部の No. 2 の位置まで動かす、少しの間装置の蓋を閉じて表面から残存する湿気を除去する。蓋を開き、試験表面を色の変化に因って検査する。

陽性結果：

いかなる強さであっても一様な青色／紫色の反応円が装置表面の中心部に現われる。

陰性結果：

いかなる強さでも、青色／紫色の反応円が試験表面上に現われない。

工程上の対照は各試験装置上に存在する。各々の陽性または陰性試験の終了時に試験表面の中心に小さな青色／紫色の点として現われる。陰性試験結果は工程対照のみを示す。陽性対照結果は反応円の中に工程対照を示す。非常に強い陽性結果の場合には、工程対照は反応円内であり明白でないこともある。

工程対照が現われなければ、指示に従って工程を反復することができる。反応した試験表面および陽性反応に結びついた色の変化は時間が経過しても劣化しない。従って、試験装置は永続的記録とみなしうる。試験装置を参考のために取っておく場合には、蓋の中の吸取り材料を取り出して、生物災害容器に廃棄する。保存のため装置は閉じておくべきである。

#### 実施例20：OIA装置の感受性

ストレプA OIAの分析感受性を、既知の濃度の細胞懸濁液を使用し、各々のキットの検定プロトコールに従ってこの懸濁液の一部を抽出することにより、市販のストレプAキットと比較した。化膿球菌球菌、ランスフィールド分枝A群を、斜面培養管での一次培養として American Type Culture Collection (ATCC No. 12344) から入手した。細胞懸濁液は滅菌通常生理食塩水から作製し、通常生理食塩水で無菌的に希釈した。試験からの結果は、本発明のOIA装置が少なくとも6種類の市販試験キットと比べて少なくとも10～100倍感受性が高いことを示している。

表17は、ストレプA OIAの臨床的感受性をいくつかの市販の迅速ストレプA検定の製品取扱い説明書の記載と比較したものである。これらの迅速検定の大部分は、ストレプAコロニー計数が20未満のサンプルはすべて切り捨てられ、ストレプA OIA検定で示された数字においては、いかなるサンプルも差し引かれなかった。ストレプA OIAはこれらの迅速試験に比べて感受性の有意の改善を示す。

表 17

管口スワブからの直接のA群連鎖球菌検出についての試験キットの比較<sup>1</sup>

製品名/ 製造業者	方法	検定時間 抽出/反応	感受性	特異性	正確度	予知性	
						陽性	陰性
ストレプA OIA BioStar Medical Products, Inc.	ケイ素基板上での重量増	2-10分 4分	100% <sup>1</sup>	98.3%	99.1%	100%	98.9%
OIAストレプA BioStar Medical Products, Inc.	ケイ素表面上のAb検出	2-10分 2分	83.3% <sup>1</sup>	97.4%	94.7%	88.2%	96.1%
試験パック+ ストレプA Abbott Labs	膜上のAb検出したコロ イド	1-30分 5分	93.7%	94.5%	94.3%	89.7%	95.7%
Carda-QSストレプ A Pacific Biotach, Inc.	膜上のAb検出、青色し たらチェック	2-40分 5分	95.6% <sup>1</sup>	96.8%	96.7%	95.5%	97.6%
Directigen L 2.3 ストレプA Becton-Dickinson	膜上のAb検出、青色し たらチェック	3-120分 記載なし	90%	92%	91.2%	75% <sup>1</sup>	97% <sup>1</sup>
Reread Colour ストレプA Wellcome Diagnostics	Ab検出、青色したラテ ックス、成膜	2分 3分	86%	94%	91%	81%	96%

1. 製造業者の製品取扱い説明書から得たデータ
2. すべての標本に基づく
3. 製品取扱い説明書の中の表から計算したデータ
4. 標本プレートのコロニー計数が製品取扱い説明書に示されていない

スワブ1本と標準培養法を用いて培養の状況を呈する患者からスワブを収集した。この試験では、4つの独立した検査施設を使用した。標準培養法直ちにスワブを輸送チューブに戻し、輸送媒体を含むカプセルを押し除いた。各施設で5%ヒツジ血琼脂天(SBA)プレートに標本を接種し、次に35℃~37℃でインキュベートした。4施設の内2施設では嫌気的条件下でプレートを24~48時間インキュベートし、2施設では二酸化炭素強化環境でプレートをインキュベートした。各施設は結果を陰性または陽性として報告し、陽性に関してはセロタイピング法によって確認した。

接種後、スワブを輸送チューブに戻し、ストレプA OIA試験工程に従って検定した。溶液を生じる酸を3滴抽出チューブに加え、よく混合して乾燥試薬を溶解した。スワブを抽出チューブに入れ、抽出試薬で十分に飽和させ、溶液中で2分間インキュベートした。中和溶液3滴を抽出チューブに加え、スワブを使って試薬を混合した。抽出したスワブをチューブの側面に押しつけて絞りだし、その試薬を棄した。この抽出法はほとんどの迅速GAS試験に共通するもので、周囲からGAS汚染を遠ざける。

触媒1滴を抽出物に加え、十分に混合した。この溶液1滴を試験片(図8A~8G)の中心に適用した。サンプルを試験表面上で2分間インキュベートし、その後試験表面を水で洗い流し、重を削って採取し乾燥した。質量増大剤1滴を試験表面の中心に適用し、4分間インキュベートした。表面を再び水で洗い流し、先と同様に採取した。試験結果は培養結果の知識なしに判定した。

増大培養法を、細菌の存在を確認するようにデザインした。この方法では、すべての輸送チューブから外科用綿糸糸(輸送媒体とスワブを分離する様子)を取り出し、トッド・ヒューウィット培地に入れて、35℃~37℃で24~48時間インキュベートした。細菌に一致する増殖パターンが認められれば、コロニーを選択し、必要であれば再分離して、市販の通称球菌セロタイピングキットを用いて確認した。

寸法の試験片も使用できる。サンプルを、スライドの長さに沿って均一な間隔で20μlの滴として適用した。試験表面の背景調整のために1切片を置いた。サンプルをこれまでの実施例の中で述べたように検定した。

試験細片を機器のサンプル台の上に置き、表面の背景切片を枠内の中心に置いた。サンプル台はx、y位置付け能力を持つ。試験表面が位置付けられれば、フォトダイオードで背景の読取りを行った。LEDは背景切片の背景強度をボルトで表示する。コンピュータのソフトウェアも背景強度を記録するようにデザインされていることもある。この測定が終了した後、台を過めて陽性サンプルからの読取りを記録した。電圧値を直接記録したが、サンプルから背景を差し引いたものを記録してもよい。すべてのサンプルが測定されるまで台を前進させた。

機器による読取りは、あらかじめセットされたシグナルに関してイエスまたはノーの定性的回答を与えることができる。検定は陰性対照と低陽性、あるいは診断強度を含む、この閾値に関してサンプルを客観的に評価する。

検定が定量的であれば、試験表面あるいは試験装置は陰性対照と1またはそれ以上の既知の陽性対照を測定することができる。定量的にサンプルの数値をこの曲線と比較する。考慮している適用に半定量的回答が適していれば、陽性対照はいくつかの広範囲をカバーしうる。

#### 比色光密度比較値光解析装置

この装置は、照準を合わせた光源の使用によるより小さな光路、より小さな参考表面、より小さなサンプル台、光源のすぐ隣に位置する偏光子、および検出器を有しており、表面の視覚検査に必要なレンズ系が削除されている。

この特殊機器の読取りのプロトコールは、5つの別個のサンプル、あるいは4つの対照と1サンプル、2対照と3サンプル、等々に対応する。サンプルスライドを、スライドの位置を制御する回転柱に挿入する。読取りは視覚による位置付けではなく、試験表面へのサンプルの配置と台の前進によって達成される。x、y位置付け台を修正することにより、試験表面のどのような配列にも使用できる。

臨床試験では、4施設から合計178サンプルを検査した。SBA培養法は70個本を陰性と判定し、これらの個本の内4つは増大培養法による陰性と判定された。増大培養法は92個本を陰性と判定した。SBA培養の感受性は、検討した頻度と個体群に関して増大培養法に比し71.7%であった。これらのデータは、従来のSBA培養法が増大培養法よりも感受性が低いことを示す先の文献の結果を裏付けている。従って、従来のSBA培養法を「ゴールドスタンダード」とみなすことは再評価されるべきである。

OIAの結果をSBA培養法と増大培養法の両方に関して評価した。ストレプA OIAは検討した頻度と個体群について92.9%の感受性、94.8%の特異性、94.6%の正確度を生じた。ストレプA OIAはSBA培養法に比べ特異性が低いと思われる。しかしながら、ストレプA OIAでの26の見かけ上の偽陽性は実際には真性陽性であったので、本当の限界はSBA培養法の方に存在する。培養に関するストレプA OIAの感受性は、4つのSBA陽性結果がストレプA OIAでは陰性であったために低いように思われる。これらの結果はその増大培養法で培養非分離であると判定された。ストレプA OIAは92の増大培養陽性のうち91を検出し、98.9%の感受性を生じた。読取結果はコロニー計数にかかわらず収集したすべてのデータを含むことに注意することが重要である。

#### 実施例21: 機器による読取りのプロトコール

##### 1) フォトダイオード修正比較値光解析装置

上記に述べたように比較値光解析装置を修正した。接触鏡をCCDカメラに換装し、サンプルを枠内十字線の中心に置いた。サンプルの斑点が枠内に完全に納まるようにズームを調節した。

検定に使用した試験細片は幅1cm、長さ4~5cmであった。これらの寸法は手取り扱いやすい。適切なデザインのサンプル位置決め装置があればどのような

このことは、多数のサンプルを検査することのできる試験表面の使用を可能にする。

この機器は、一定のサンプルサイズに適合するように改造されたフォトダイオード検出器を使用しており、スライドの位置付けとサンプル適用によってサンプルの斑点が遊移を調たす。読取りは機器のカバーのLED表示から行う。読取りはミリボルトである。

#### 実施例22: 多克隆性抗体

多クローン性または単クローン性のいずれかの抗GBS抗体を前に述べたシロキサン被覆表面に固定化することにより、光学的に活性な試験表面を作製した。抗体は群特異的であったが、GBS多量種に関して認められる群特異的エпитオプのいずれに対しても特異的であると考えられる。使用した多クローン性試料は、全細胞に侵襲させたGたんぱく質型IαG分画であった。被覆抗体濃度は100μg/オブラートにつき抗体150~500μgの範囲であり、2~8℃で12~16時間被覆した。100μg/オブラートは495人量化法被覆があってもなくてもよい。特に、単クローン性抗体は50μg/オブラート、pH 5.0を含む緩衝液中200~300μg/オブラートで最も良好に被覆することを認めた。多クローン性抗体は、同様に0.1M HEPES、pH 8.0を含む緩衝液中で良好に表面被覆することを認めた。5.0~8.0のpH範囲をカバーする緩衝液は有効な抗体被覆を与えることが示されている。ひとたび抗体が試験表面上に固定化されれば、50μg MOPS、pH 7.0中0.5%分解ゼラチンのオーバーコートを前に述べたように適用する。抗体被覆した試験表面を使用前に試験装置のひとつに置いた。

GBS検定の質量増大のため、ナカネの通称多克隆性法を用いて群特異的多クローン性抗体試料をHRPに結合した。9.75以上の高いpHでのHRPへの抗体の結合は、非特異的結合の上昇を生じた。最適な結合pHは9.0~9.75と確認された。

特表平7-509565 (36)

表 18

検定時間の間数としてのGBS感受性

感受性*	検定時間*
$3 \times 10^3$	5'
$9 \times 10^4$	10'
$3 \times 10^5$	15'

\* 感受性は細胞/スワブの数で表わされている。

\* 時間は分である。

\* インキュベーションの時間は、サンプル/複合体については1分間、表面上のサンプルについては2分間、基質については2分間であった。

\* インキュベーションの時間は、試験表面上のサンプルと基質に関してそれぞれ5分間であった。

\* インキュベーションの時間は、サンプル/複合体、表面上のサンプル、基質に関してそれぞれ5分間であった。

表 19

最終検定 pH の間数としての GBS 検出

細胞	pH6.75	pH7.0	pH7.25	pH7.75	pH8.0
$3 \times 10^3$	10+	10+	10+	10+	10+
$3 \times 10^4$	7+	7+	7+	7+	7+
$3 \times 10^5$	2+	2+	2+	2+	2+
0	-	-	-	-	-

#### 実験例23: クラミジアの検出

495人置化培養液を調製した、または置き換え光学的に活性な試験表面を、前に述べたように重合体シロキサン、Tポリマーで被覆した。これらの重合体被覆した支持体を、100mM 炭酸ナトリウム、pH9.6中1~10μl/mlのウシ

GPS特異的抗原を、酸抽出プロトコルを用いて微生物から抽出した。0.25M酢酸と2.3M塩化ナトリウムの混合物を使用して次亜硝酸を生成した。酢酸は0.1M~1.0Mの範囲でGBS抗原を有効に抽出することを認めた。2分間抗原を微生物から抽出した。ここで述べるすべての結果はATCC菌株 No. 12386を使用した。1.5M MOPS O、pH 7.3、0.2%トウイン20、0.5%プロクリン300および20mM EGTAを含む緩衝液を使用し、等量の中和緩衝液を加えることによって溶液を中和した。最終的な pH の範囲は6.0~7.5が望ましい。

抽出した抗原を、50mM MOPS O、pH 7.0、アルカリ処理カゼイン20mg/ml、0.3%トウイン20および0.5%プロクリン300を含む複合体試料の1:150希釈溶液と5:1の割合(サンプル:複合体)で混合した。3:1から10:1の間のサンプル:複合体比率が受け入れ可能であった。サンプル/複合体混合物を室温で5分間インキュベートし、その後混合物20μlを試験装置に適用して、室温で5分間インキュベートした。装置を前に述べたように使用して試験表面を洗浄し、乾燥させた。試験表面が乾いた後、TMB底液反応基質1滴を装置に適用し、室温で5分間インキュベートした。洗浄/乾燥プロトコルが完了した後、試験結果を解釈した。機器による結果が望ましい時には、試験表面を脱イオン化水流の下で洗浄し、室温で乾燥することにより洗浄/乾燥プロトコルを実施する。サンプル/複合体の最初のインキュベーションは必要ではなかったが、検定の感受性を上昇させることが認められた。インキュベーションの時間を追加すれば検定の感受性はさらに上昇すると考えられた。

現行のGBS検定は最終抽出 pH の変化に対してすぐれた耐性を示した。低酸性の検定は6.75から8.0の範囲にわたる pH の変化によって影響されなかった。表19参照。評価結果のために検定尺度を確立した。1+または2+は金色の背景に非常に薄い紫色の斑点であった。10+の数値は非常に強い青色の結果である。

血清アルブミン(BSA)溶液により、2~8℃で12~16時間さらに被覆した。次に試験表面を50mM MOPS、pH7.0中0.5%分解ゼラチンにより室温で20分間被覆し、その後室温で乾燥させた。被覆した試験表面を前に述べた準回使用試験装置に置いた。

サンプルの検定に使用した合成ファイバースワブを0.1%(v/v) ケノデオキシコロール酸(CDOC)とナトリウム塩を含む0.01M PBS溶液(約120μl)中に浸漬することにより、スワブからクラミジア特異的LPS抗原を抽出した。前記の溶液は、あらかじめ1.0N NaOHの緩衝液10μl/mlで最終pH11.5にアルカリ化しておいた。最初に、CDOCを無水メタノール中0.2g/mlで可溶化した。スワブを、理想的にはこの溶液中で約10秒間浸漬させ、その後室温で5分間インキュベートした。次に陽性抽出チューブ(ポリプロピレン)に圧迫を加えてスワブから残留溶液を絞り出した。0.1%CDOCを含む等量の100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH7.0を加えて最終pHを7.0~7.5に調整した。

ナカネの方法を用いて抗クラミジアLPS抗体をHRPに結合することにより、質量増大試薬を調製した。複合体溶液を、50mM MOPS O、pH7.0、アルカリ処理カゼイン20mg/ml、0.3%トウイン20および0.5%プロクリン300を含む希釈剤中で1:75~1:200に希釈した。

抽出したサンプル約30μlをBSA/重合体シロキサンの試験表面上に塗せ、室温で5~10分間インキュベートした。次に、HRPに結合した抗クラミジアLPS抗体約30μlを試験表面上のサンプル斑点に添加し、室温で1~5分間インキュベートした。試験表面を水1~2mlで洗浄し、前に述べたように装置内で乾燥させた。TMB底液反応基質約30μlを表面に適用し、室温で10~15分間インキュベートした。試験装置を前に述べたように洗浄し、乾燥させた。

上記の代わりに、沈殿試料を0.01M PBS、pH7.4中で1:100~1:320に連続的に希釈した。これらの希釈液5μlを、10mM NaOHを含む0.01M PBS中0.1%ケノデオキシコロール酸500μlに加えた(最

終pHは11.5であった)。これらを渦状攪拌し、室温で5分間放置した。100mM リン酸緩衝液(一塩基と二塩基混合)500μlを加えて抽出緩衝液を中和し、この溶液15μlをオブラート表面に添加した。これを室温で10分間、表面上でインキュベートした。抗LPS抗体-HRP複合体の1:75希釈溶液の部分標準15μlを表面上の抗原斑点に直接加え、指定された時間室温でインキュベートした。オブラートを脱イオン化水で洗浄し、室温で吹付乾燥した。基質(30μl)を抗原/複合体斑点に適用し、指定された時間インキュベートした。オブラートを前記のように洗浄して乾燥させ、捕獲した抗原の強度をフォトダイオード修正比較分光解析装置で記録した。データを背景に対して修正した。読取りはミリボルトで、2回の読取りの平均値である。表20参照。表20は検定の感受性への培養時間上昇の影響を示したものである。

表 20

培養時間(分)

表面	複合体	基質	抗原希釈液	mV	肉眼
5	5	10	0	12.4	-
			1:320	52.5	1+
			1:160	86.0	1+
			1:40	109.6	3+
			1:20	708.0	5+
10	5	15	0	-6.3	-
			1:320	181.6	2+
			1:160	172.9	2+
			1:40	861.1	5+
			1:20	1601.4	10+

#### 実験例24: ヒト抗HIV検出

特表平7-509565 (37)

直径100nmの珪素オブラートを前に述べたようにしてポリブタジエン(PBD)で被覆した。PBD被覆した光学的試験表面を、ウシ血清アルブミン(BSA)に結合したHIVウイルスのGP41に相当する合成ペプチド20μg/mlで被覆した。この抗原試料を10mMリン酸カリウム、0.85%NaCl、pH7.0中で希釈し、試験表面を室温で2〜3時間、攪拌しながら抗原で被覆した。試験表面を被覆液から取り出し、脱イオン化水で洗浄して、室温下で乾燥させた。GP41たんばくは非常に疎水性が高く、疎水性PBD表面によく結合する。一連の抗原抗体および抗原抗体のヒト血清サンプルを使用してGP41/BSA被覆表面を試験した。血清の5μlサンプルを試験表面に適用し、室温で15分間インキュベートした。CCDカメラの付いた修正比較偏光顕微鏡を用いて抗原表面上の抗体量を測定した。結果はグレースケール単位で報告した。

表 21

GP41被覆面上での宿主抗体検出

抗原抗体血清のグレースケール	抗原抗体血清のグレースケール
93.07	8.83
43.53	3.65
48.64	5.51
60.29	7.64
65.36	3.62

12.15グレースケール単位(陰性+3標準偏差)の数値を陽性反応とし、抗原抗体血清について報告された平均値は5.85±2.1グレースケール単位であった。抗原抗体血清について報告された様々なレベルのグレースケールは様々な抗体量を反映している。

HIVウイルスのGP41とP24の融合である組換え抗原試料も同様に、本発明の光学的試験表面のための被覆材料として評価した。直径100nmの珪素オ

ブラートを前に述べたようにしてPEIで被覆した。50mM炭酸ナトリウム、pH8.0中2.5μg/mlの融合たんばくを含む被覆液中にこの光学的試験表面を浸し、室温で3分間インキュベートした。その後光学的試験表面を脱イオン化水で洗浄し、室温下で乾燥させた。光学的試験表面を血清対照に対する反応に關して試験した: 陰性、低度、中等度、および高度陽性抗HIV。各血清サンプル5μlを表面に適用し、室温で15分間インキュベートした。表面を脱イオン化水で洗い流し、室温下で乾燥させた。上記に述べたようにして修正比較偏光顕微鏡で結果を得た。

表 22

GP41/P24による抗体検出

血清サンプル	グレースケールの数値
陰性	0.0
低度	29.28
中等度	41.22
高度	52.94

実験例25: RSV検出

光学的に活性な試験表面を前に述べたようにして重合体シロキサンで被覆した。これらの表面をモノクローナル抗RSV抗体溶液10μg/mlに入れた。次のものを含めた多数の緩衝液を抗体被覆ステップにおいて検討した: HEPES, pH8.0; アセテート, pH5.0; 炭酸塩, pH9.5; ホウ酸塩, pH8.0; およびリン酸塩, pH7.4。緩衝液はすべて0.1Mの濃度であった。0.1M炭酸ナトリウム, pH9.5が最善であることを認めた。系列検定を用いて表面試料を分析した。陽性対照の部分標本20μlを表面に適用し、室温で10分間インキュベートした。表面を脱イオン化水で洗い流し、室温下で乾燥させた。抗体・HRP複合体(20μl)を試験表面に適用し、10分間インキュベートし

RSVの長管様からのUV不活性化抗原試料を調製した。これは合計2×10<sup>6</sup>PFUを含んだ。この抗原試料を緩衝液中に1:1に希釈し、上記に述べたように検定した。それぞれのサンプル15μlを表面に適用し、これは使用しうる総抗原の7.5%に相当した。

表 24

RSV標準曲線

抗原濃度	偏光検出後の強度(mV)
0	0.0079
1×10 <sup>6</sup>	1.0221
1×10 <sup>4</sup>	0.3124
2×10 <sup>3</sup>	0.0466

実験例26: 薄膜アナライザー (Thin Film Analyzer) の検出感度

Lundstromらの米国特許第4,521,522号には、入射光が偏光子を通過し、測定される物質に対してブルースター角で反射される装置が記載されている。その入射光は入射面と入射角に対し平行に偏光される。この装置は一つの偏光子しか使用する必要がないが、第二の偏光子を用いる場合は、第二の偏光子は第一の偏光子に対して正確に90°に設置しなければならない。入射光が反射されると偏り(polarization)に変化が全くないので、単一の偏光子が必要なもののすべてである。この偏りについて、入射角に対する偏りに変化がないということは、偏光子が入射光または反射光のいずれかに設けられなければならないことによって保証される。試料に対する入射光および入射面に対して平行に偏光された反射光の両者のごく一部だけが測定される。

この方法は、入射面に平行に偏光された光が、誘電体媒質の界面に入射すると、この角度で観測される反射率が最小であることに基づいている。この現象はブルースター角においてのみ観測される。屈折率が高い基底が必要である。反射

で洗浄・乾燥し、次に抗原反応基質20μlを10分間適用して洗浄・乾燥ステップを行った。2〜8℃で12〜16時間抗体を被覆した。表面を洗い流し、0.5%分解ゼラチン、50mM MOPS、pH7.0を含む溶液中室温で20分間インキュベートして、その後室温下で乾燥させた。

質量増大法をナカネの方法によって調製した。RSVの核ペプチドに対するモノクローナル抗体をHRPに結合した。複合体原液を、50mM MOPS0、pH7.0、アルカリ処理カゼイン20mg/ml、0.3%トウイーン20および0.5%ブロックリン300を含む溶液中で1:30〜1:250に希釈した。

もうひとつの検定プロトコルは、鼻腔洗浄液30μlとPBS中10%トウイーン20を30μl、複合体の1:40希釈液30μlを十分に混合することを含んだ。このサンプルの部分標本30μlを試験表面に適用し、室温で12分間インキュベートした。単回使用試験装置について述べた洗浄と乾燥のプロトコルを使用した。TMB抗原反応基質を表面に適用し、室温で8分間インキュベートして、洗浄し、乾燥させて検定した。

表 23

RSV標準曲線

希釈倍率	偏光検出後の強度(mV)	内蔵
0	0.0020	-
1:1280	0.0244	-
1:640	0.0256	+
1:320	0.0356	1+
1:160	0.0684	2+
1:80	0.0578	2+
1:40	0.1198	3+
1:20	0.2236	4+
1:10	0.5235	5+
1:5	0.8833	

性は高いが屈折率が低い金属は、この方法に対してレフレクシオンミニマム (reflection minimum) が浅すぎる。

小さい厚みの変化のよりすぐれたシグナルレゾリューション (Signal resolution) を得るには、上記の方法には、最小の誤取り値を偏光について観察される反射曲線に容認できる状態にシフトして、小さな厚みの変化で反射光強度の大きな変化を起こさせるため、基板を酸化物の層で覆う必要がある。接着層がある場合は、この層はレフレクタンスミニマム (reflectance minimum) に対して基板を最適化するために設けられているもので受容材料 (receptive material) の性能を増大するためのものではない。

Lundstromが報告している純粋な平行偏光 (p-偏光) を用いると、被検体 (analyte) を取付けた場合の反射率 (%) の変化が非常に小さいことが観察され、光偏りに変化が全くない。本発明では、入射光には、p-偏光に加えて垂直偏光 (s-偏光) の成分がある。薄膜との相互作用によって偏光の回転に非常に大きな変化がみとめられ、そして偏光の回転のこれらの変化は強度の変化とともに測定される。

入射光の角度が非常に大きい場合、本発明を使用すると、試験面から反射される光にある程度の偏円偏光性 (ellipticity) が生じる場合がある。本発明によれば、付加された集合体 (mass) によって反射される場合の偏りの回転の変化が最大になり、これに伴い、反射率が最小になることはない。本発明によって観察される反射時の偏りの回転は、純粋な平行偏光の場合全くない。本発明の別の利点は、本発明はブルースター角には依存していないので、ほとんどすべての基板と誘電層を用いることができるということである。また入射光の角度は重要ではなく、かつ基板の材料の種類によって変える必要がない。

本発明は、レーザーのような単色平行光線を用いる。また本発明には、光源と試験面との間に、p-偏光成分とs-偏光成分の両者が試験面上に入射するように配置された偏光子が含まれている。その光源が十分に偏光されている場合はこの偏光子は不要である。試験面から反射された光は第二の偏光子 (アナライザー) を

通過してフォトダイオードに入る。s-偏光の一部が選択されて、そのシグナル変化を厚みの関数として最大に、一方低いバックグラウンド光の強度を維持する。その光は反射時に偏円偏光され、偏りの偏円偏光性と回転角はその面の光学的特性に非常に鋭敏に依存している。次にその光は、米国特許第4,332,476号、同第4,665,595号および同第4,647,207号に記載されているような比較エリプソメーター (comparison ellipsometer) 内で参照面で反射され、その参照面は、試料の面と光学的に同一である領域で偏円偏光性を除去する。本発明は、与えられた材料の正確な物理的な厚みまたは屈折率を確かめるよう設計されていないので参照面を必要としない。かわりに、アナライザーを通過した光の強度が、偏円偏光性には付随する偏りの回転の尺度になり、その結果、その面の光学的特性の相対的尺度になる。したがって上記光の強度は、被面材料の厚みと屈折率の変化を測定するための簡単な手段になる。

測定のプロトコルは、誤取りを行う場所を決定するx、y位置決めプラットフォームを用いる上記装置の場合、ほとんど変えなくてもよい。しかし分析を行う偏光子 (analyzing polarizer) は、初期誤取りを行う前にバックグラウンドに対して予め選択された値まで回転させねばならない。好ましい実施形態ではアナライザーの近くに偏光子を置いている。光はアナライザーを通過して検出器に入る。誤取り値は、ボルトもしくはミリボルトの単位で記録される。誤取り値は、LEDもしくは他の表示装置に表示してもよく、またはデータ処理パッケージで簡便してもよい。

薄膜の明度に対する折衷および、シリコンから反射される光の波長依存性を、コンピュータシミュレーションでモデル化した。屈折率が1.459の薄膜の応答を、シリコンの表面を用い、かつ厚みを0から12nmまで変えてモデル化した。試験した波長の範囲は、400~420nm、540~560nmおよび680~700nmであった。最小明度から最大明度まで明度が增大することは、厚みの増大の関数として光の強度が増大することを示す。明度は光の強度の対数関数である。このデータから、厚みの関数として最大の感度の変化は540~560nmの光線で作られた。これらのデータは

70°の入射角を用いて得たが、その値は入射角によってわずかに変化する。

表 23			
波 長	最小明度	最大明度	変 化
400~420	-6.5	-4.5	-2.0
540~560	-4.2	-1.7	-2.5
680~700	-6.0	-4.3	-1.7

これらの観察結果を確認するため、実施例28に記載されている9分間抗原検定法 (9 minute assay) を用いて、標準抗原抗体曲線を作成した。その抗原抗体曲線からの強度を、フォトダイオードを改良した比較エリプソメーター (comparison Ellipsometer) を用いて、入射光の波長の関数として測定した。薄膜アナライザーは比較エリプソメーターを簡略化したものであるから、類似の試験結果が得られるであろう。各種の波長の入射光は、白色光を狭い帯域フィルターでフィルターし、特定の波長光を選択することによって得た。フィルターはすべてCorion P70シリーズのフィルターであった。

表 26		
入射光	抗原濃度	9V応答
白色光	0	310
	1:9600	317
	1:4800	319
	1:2400	371
	1:1600	483
	1:1000	780
	1:400	1128
	0	28
	1:9600	29
	1:4800	30
550nm	1:2400	36
	1:1600	56
	1:1000	93
	1:400	176
	0	33
	1:9600	33
	1:4800	34
	1:2400	42
	1:1600	68
	1:1000	113
800nm	1:400	221
	0	9
	1:9600	9
	1:4800	9
	1:2400	11
	1:1600	17
	1:1000	27
	1:400	50
450nm	0	9
	1:9600	9
	1:4800	9
	1:2400	11
	1:1600	17
	1:1000	27
	1:400	50

## 実施例27: 薄膜アナライザーの角度依存性

図14aに示す薄膜アナライザーは、672nmのダイオード光源およびセットアップダイアグラム化された二元偏光子 (dual polarizer set-up diagrammed) を使用した。レーザーダイオードとホトダイオードはともに、入射光の法線角 (normal angle of incidence) に対して入射と検出の角度を正確に測定するよう設置した。ストレップA (sorep A: (通称伏球面A) 抗原の特異抗体を使用してアナライザーの角度依存性について試験した。薄膜アナライザーとともに使用した検出器は予め飽和し、実際のダイナミックレンジは3500mvである。参考のため上記抗原抗体も、672nmのレーザーダイオード源を備えた小型の比較エリブソメーターで試験した。

表 27

比較エリブソメーターの読取り値

抗原希釈	平均mv	3SD	レンジ
0	180.3	9.69	150.6~170.0
1:9600	190.4	5.58	184.8~195.9
1:2400	357.4	15.9	351.1~383.3
1:1000	766.0	26.3	739.7~782.3
1:400	1623.7	1.4	1622.3~1625.1

表 28

薄膜アナライザー

角度	抗原希釈	平均mv	3SD	レンジ
30°	0	0	12.0	
	1:9600	88.0		
	1:2400	90.0		
	1:1000	188.0		
	1:400	204.0		
40°	0	0	64.0	
	1:9600	78.0		
	1:2400	84.0		
	1:1000	197.0		
	1:400	343.0		
50°	0	221.3	7.95	213.4~229.3
	1:9600	263.4	13.2	250.2~276.6
	1:2400	370.9	28.2	342.7~399.1
	1:1000	574.2	54.0	520.2~628.2
	1:400	1063.7	76.8	986.9~1140.5
56°	0	133.3	9.0	124.3~142.3
	1:9600	158.0	11.7	146.3~169.7
	1:2400	340.1	44.4	295.7~384.5
	1:1000	554.4	110.1	444.7~664.9
	1:400	1025.2	84.8	940.7~1109.8
60°	0	308.9	18.6	290.3~327.5
	1:9600	352.3	9.6	342.7~361.9
	1:2400	568.9	55.6	533.3~606.5
	1:1000	1070.7	159.0	911.7~1229.7
	1:400	1651.0	0.0	1651.0
70°	0	1300.0		
	1:9600	1372.0		
	1:2400	1482.0		
	1:1000	1649.0		
	1:400	1649.0		

\*: 10個の別個読取り値の平均mv/シングル

.: これらの角度での一回の測定値を示す

30°~40°の範囲の入射角で薄膜アナライザーは優れた感度を示し、そして観察されたダイナミックレンジは、限定された範囲の必要条件での検定に適している。50°~60°の角度が感度とダイナミックレンジの両者の必要条件に適合している。バックグラウンドは、65°を超える角度の場合、単一の偏光子では充分最小にすることはできない。このバックグラウンドは電子的手段によって減らすことができる。これらの角度のダイナミックレンジはかような修正機構を作動させるのに充分なものである。

## 実施例28: ストレップA検定に対する比較エリブソメーターの感度

低感度の試料の読取り易さをさらに高めるストレップA検定法のプロトコルが開発された。試料 (ストレップA抗原) を複合体 (conjugate) と混合し、次に室温で3分間インキュベートした。この混合物の20μlを試験面に塗布し、3分間インキュベートした。すすぎ/乾燥のプロトコルを先に述べたようにして、一回使用の器具もしくは室温乾燥下で行った。基質を塗布し、3分間インキュベートし、続いてすすぎ/乾燥のプロトコルを実施した。抗原希釈曲線についての試験結果を、空変イキがある場合とない場合 (可視: 非可視) について試験面で得た。可視の試験結果は、パープルが薄いパープルから暗紫色に色が濃くなるのを検出した。空変イキなしの面は反応させ、すすぎ、次いで一回使用の器具内に入れることなく乾燥した。これらの面を、ホトダイオードを改造した比較エリブソメーターで試験した。読取り値はmvの単位で報告し、かつバックグラウンド測定値について修正した。抗原希釈試験に基づいた装置による検出によって、ストレップA OIA検定法の性能が8倍に増大することが観察された。合計5個の曲線を試験した。

表 29

抗原希釈	可視	平均mv	3SD	レンジ
0	-	2.5	3.0	-0.5~5.5
1:38400	-	16.8	6.6	10.2~23.4
1:19200	-	38.4	12.3	26.1~50.7
1:9600	-	54.5	11.7	42.8~66.2
1:4800	1+	161.3		
1:2400	2+			
1:1600	5+			
1:1000	7+			
1:4000	10+			

本願に記載された試験キット、免疫検定装置、下塗りコーティングおよび検出法は、記載された検定方式、または各種の試薬に抗原物、キャリアプレート (callibrator) について示した容積、濃度もしくは特定の成分によって限定されない。また層、層コーティングまたは各種の試薬、添加物、対照物およびキャリアプレートのいずれかに使用した成分の類似の化学的類似物もしくは他の機能を有する均等物は、本発明の範囲内で利用できると解すべきである。

上記の実施例は、基板、AR材料、活性化剤および受容材料からなる予め作製したスライドを使用して各種の抗体を検出し、抗体結合のシグナルとして干渉色を変化させる上記の方法の効率を有用性を示すのに役立つ。

先行実施例で利用した基板の形態もしくは材料に支障されることなく、その表面にAR材料を結合させることができるかまたは、活性化されて受容材料を結合することができる機能に均等な代替品である基板形態および基板材料の多様な組合わせを利用することができる。

本願に記載の発明の態様は異なる実施形態をもち、後記の特許請求の範囲は、本発明のこのような別の実施形態のすべてを、従来技術によって限定されているものを除いて含んでいると解すべきである。

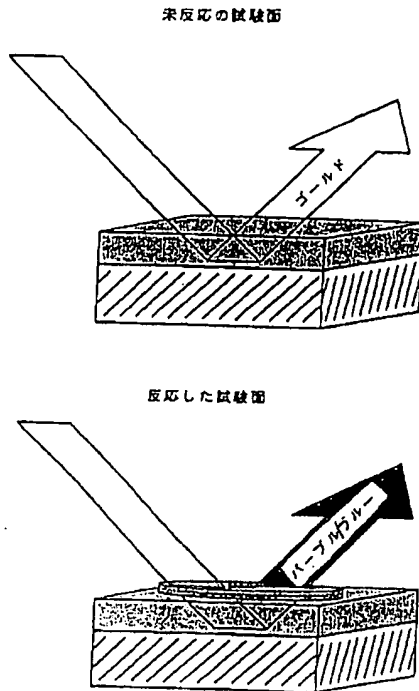


Fig. 1

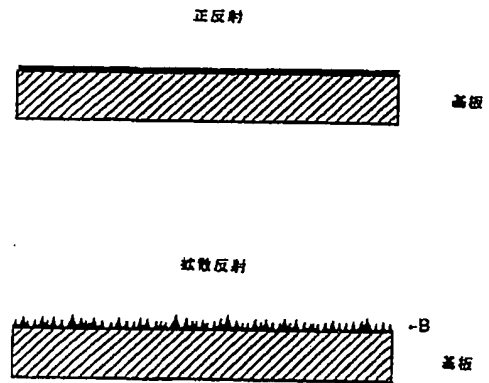


Fig. 2

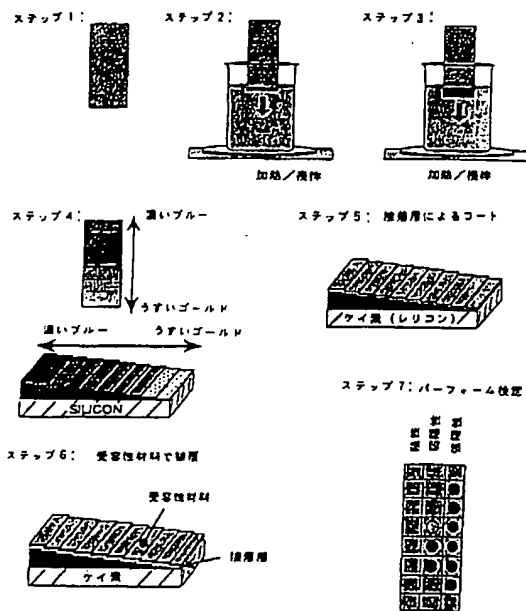


Figure 3.

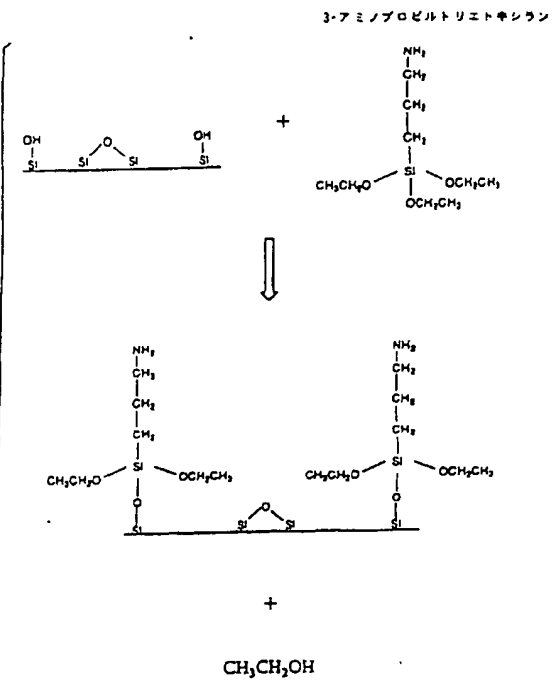


Fig. 4



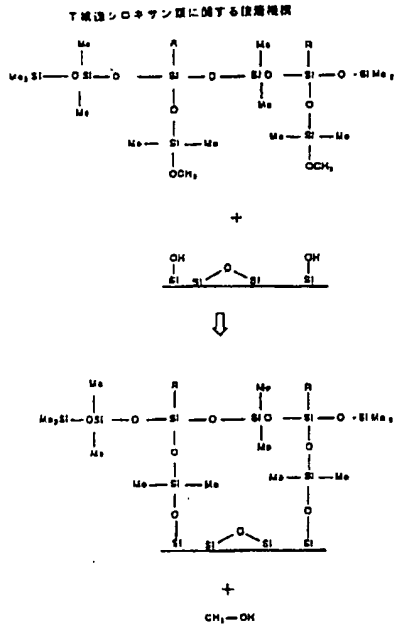


Fig. 5

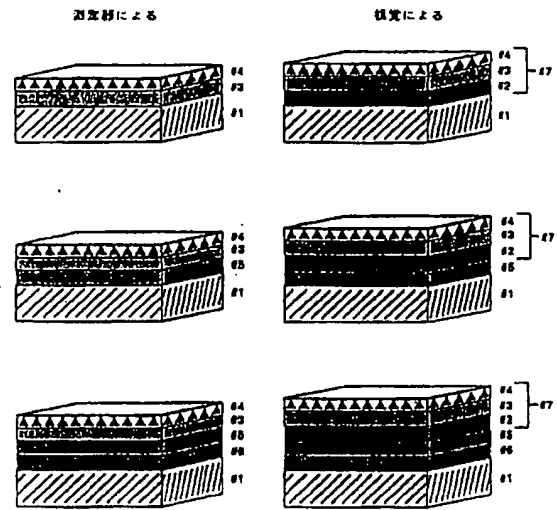


Fig. 6

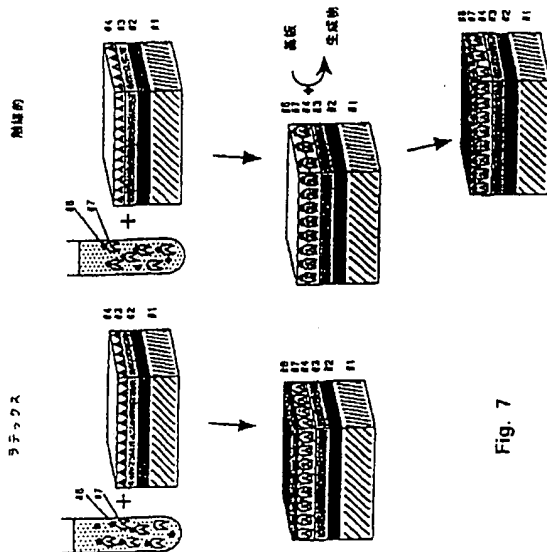


Fig. 7

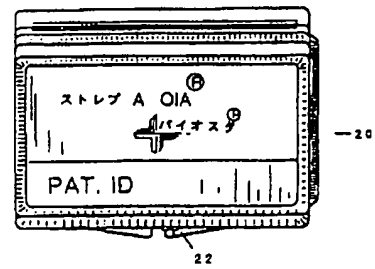


FIG. 8A

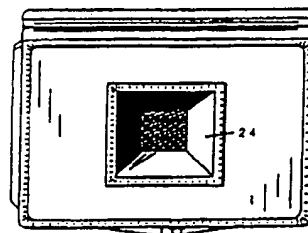
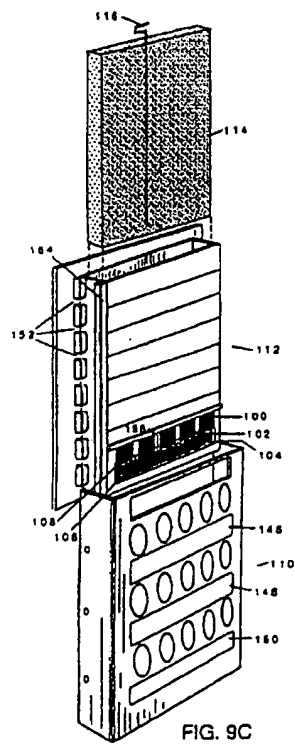
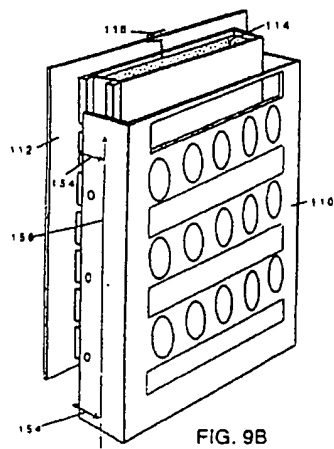
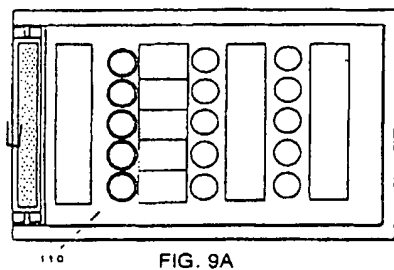
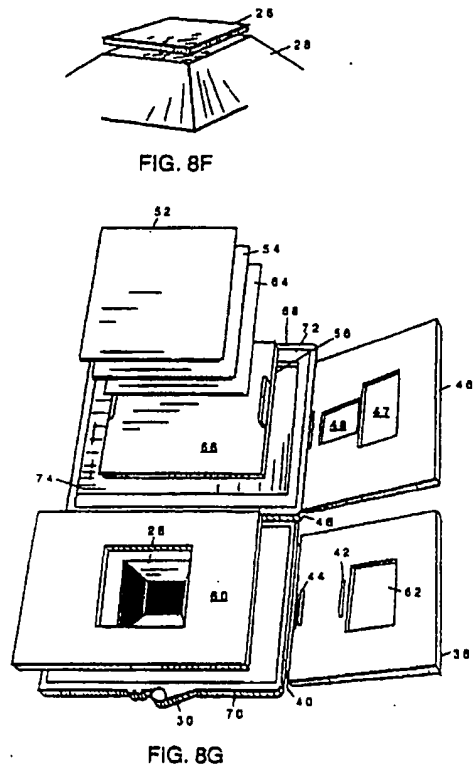
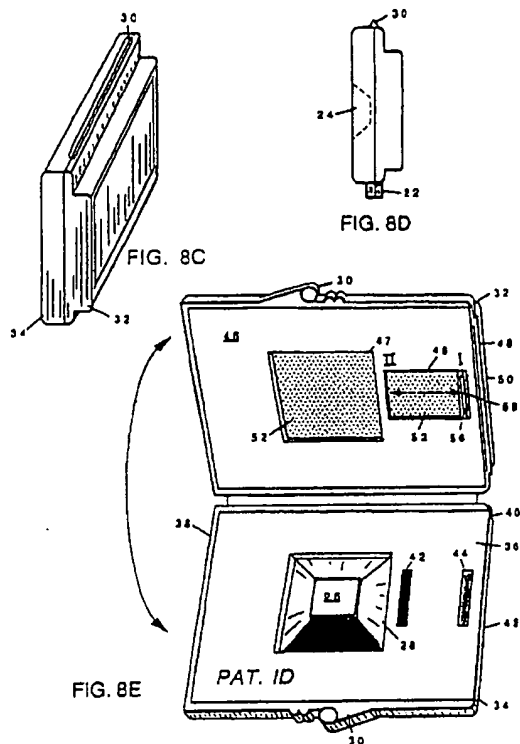


FIG. 8B



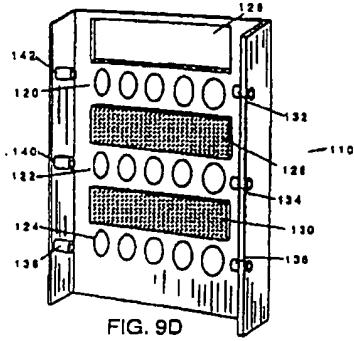


FIG. 9D

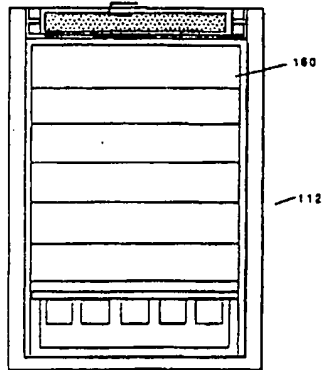


FIG. 9E

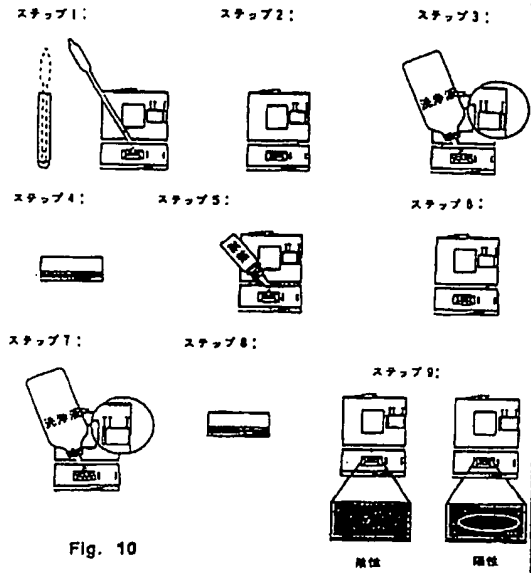


Fig. 10

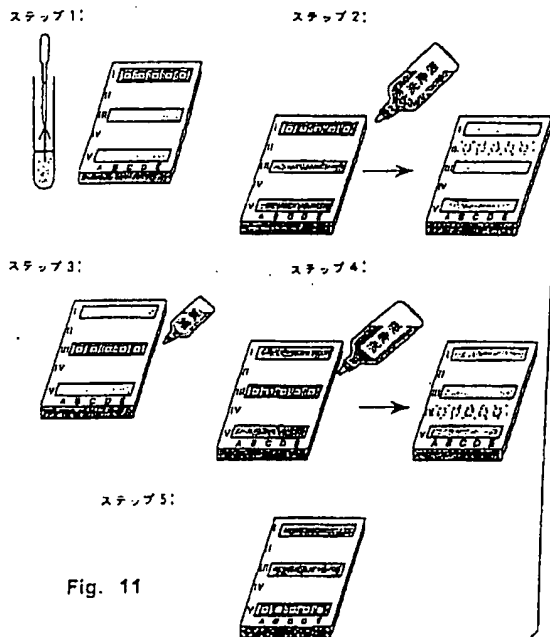


Fig. 11

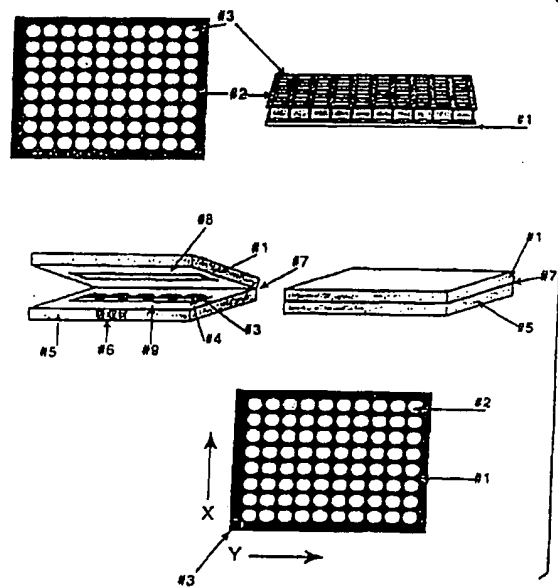


Figure 12.

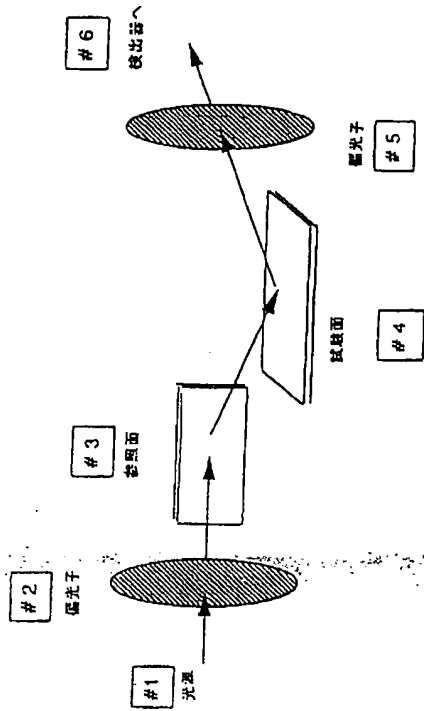


FIGURE 13

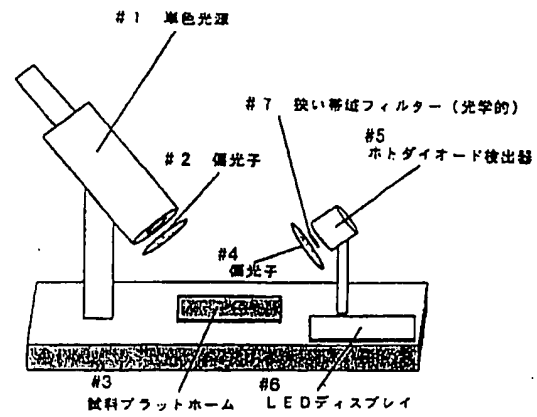


Fig. 14A

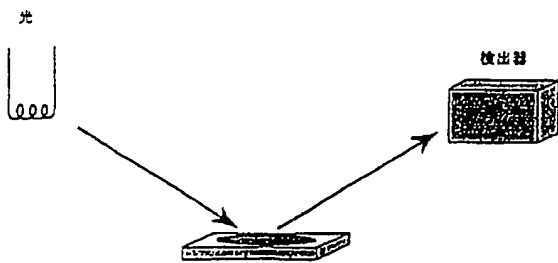


Fig. 14B

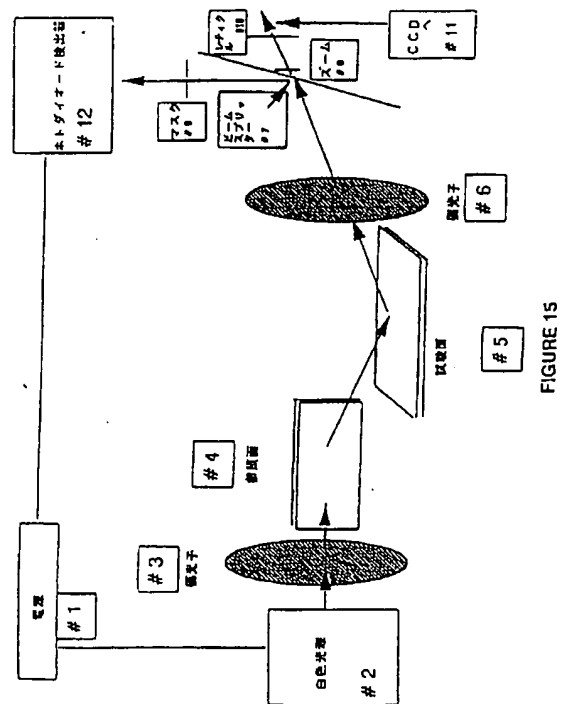


FIGURE 15

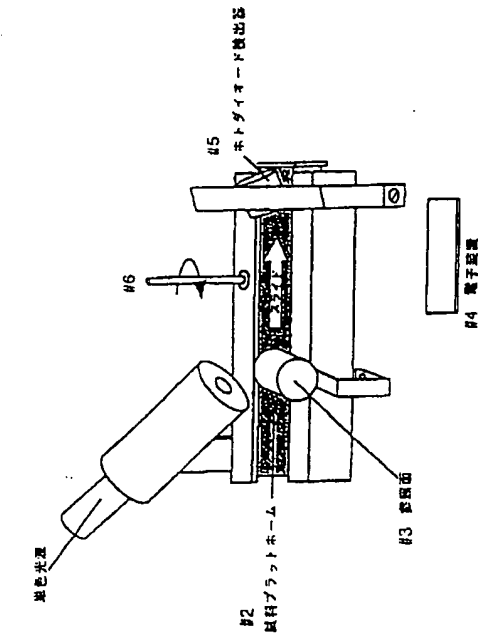


Fig. 16

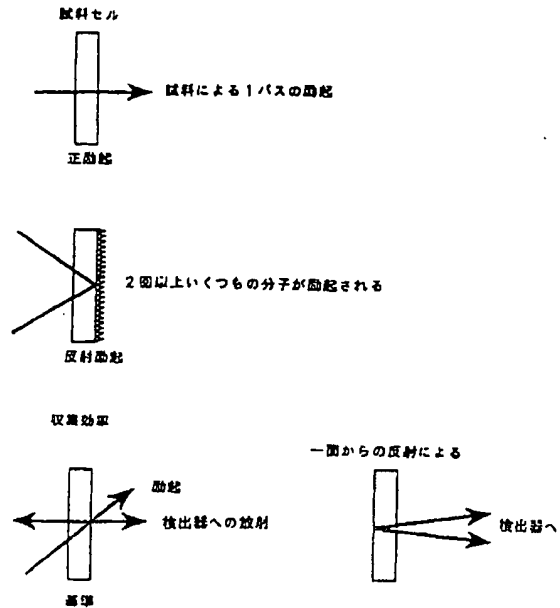


Fig. 17

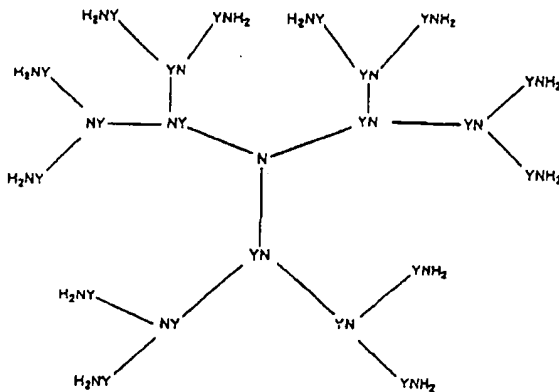


Fig. 18

国際調査報告		International application No. PCT/US1991/00417
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(2) : 01H 64/02; 01H 31/43 US CL : 356/543; 430/171 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELD SEARCHED</b> Minimum documentation searched (MDS/abstract system followed by classification symbols) U.S. : 356/543; 430/171		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the table mentioned		
Documents not been searched during the International search (reason of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Number of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US, A., 5,004,913 (KLEINERMAN) 03 APRIL 1991, see entire document.	1-42, 45-47, 53, 54, 57-62, 71-79, 81-87, 96-99
X,B	US, A., 5,325,887 (LIPSON, ET AL.) 06 JULY 1993, see entire document.	1-42, 43-47, 53, 54, 57-62, 71-79, 81-87, 96-99
X	WO, A., 91/06863 (FISONS PLC) 16 MAY 1991, see entire document.	1-47, 53, 54, 57-62, 70-99, 118-128
<input type="checkbox"/> Further documents can be found in the compilation of this C. <input type="checkbox"/> See patent, family report.		
* For classification of documents, see the International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC. * Documents published on or after the international filing date. * Documents which are classified as prior art under the provisions of Article 17 of the Patent Law of the United States of America. * Documents which are classified as prior art under the provisions of Article 17 of the Patent Law of the United States of America. * Documents which are classified as prior art under the provisions of Article 17 of the Patent Law of the United States of America. * Documents which are classified as prior art under the provisions of Article 17 of the Patent Law of the United States of America.		
Date of the international search report 23 AUGUST 1991		Date of making of the international search report 23 AUGUST 1991
Name and mailing address of the applicant See PCT Washington, D.C. 20541 Applicant No. 021/2254179		Authorized signatory MARGARET MDEKOWITZ PALL Telephoning No.



フロントページの続き

- (72) 発明者 モウル、ダイアナ・エム  
アメリカ合衆国80221コロラド、トント  
ン、ウエスト・ワンハンドレッドファース  
ト・コート、1971番
- (72) 発明者 イッター、ジェフリー・ビー  
アメリカ合衆国80302コロラド、ボウルダ  
ー、ディー・トライル・ロード1318番
- (72) 発明者 クロスビー、マーク  
アメリカ合衆国80301コロラド、ボウルダ  
ー、ルックアウト・ロード6655番
- (72) 発明者 ミラー、ジョン・ビー  
アメリカ合衆国80301コロラド、ボウルダ  
ー、フォー・リバー・ロード7223番

- (72) 発明者 ブレッシング、ジェームズ  
アメリカ合衆国80301コロラド、ボウルダ  
ー、ケイ101、シンギング・ヒル・ドライ  
ブ7412番
- (72) 発明者 ケリー、ハワード  
アメリカ合衆国80301コロラド、ボウルダ  
ー、フォー・リバー・ロード7181番
- (72) 発明者 サンドストレム、トールビヨルン  
スウェーデン国エスー435 43モールニュ  
ルケ、バーンヴェーゲン56番
- (72) 発明者 ステイブレルト、ラーシュ  
スウェーデン国エスー412 70イエーテボ  
リ、デルショーベークン51番

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成11年(1999)1月12日

【公表番号】特表平7-509565

【公表日】平成7年(1995)10月19日

【年通号数】

【出願番号】特願平6-505280

【国際特許分類第6版】

G01N 33/543 595

21/78

// G01N 21/21

【F1】

G01N 33/543 595

21/78 B

21/21 Z

# 手続補正書

平成10年 7月28日

出願人

特許庁

特許庁長官 特許第505280号

2. 補正をする者

本出願の発明者 田中 孝夫

住所 千葉県千葉市中央区新大塚 1-1-1

3. 代理人

特許 第 100-000000 号 特許 第 100-000000 号 特許 第 100-000000 号  
特許 第 100-000000 号 特許 第 100-000000 号 特許 第 100-000000 号  
特許 第 100-000000 号 特許 第 100-000000 号 特許 第 100-000000 号

特許 第 100-000000 号 特許 第 100-000000 号 特許 第 100-000000 号

4. 補正の範囲

特許 第 100-000000 号

5. 補正の理由

特許 第 100-000000 号

6. 補正の内容

特許 第 100-000000 号

(明細)

請求の範囲

1. 下記の手続き(1)および(2)を具備し、光学素子の基板上の被測定物の存在もしくは量を検出するような装置で記載される装置:

(1)基体に対してブルーフィルター以外の角度で配置された白色低反射光素子、および

(2)基体から反射される光を抽出するのに適した位置に、基体に対して傾斜角度で配置されたアナライザー

(この場合、該アナライザーは、素子基体面に対して該基体上において被測定物の位置が変動したときにアナライザーを透過する該基体からの反射光の強度変化を検出するように構成で記載される)。

2. 入射光の角度が、光素子基体面に対する法線から30°〜70°の範囲にある請求項1記載の装置。

3. 検出器の角度が、光素子基体面に対する法線から30°〜70°の範囲にある請求項1記載の装置。

4. 偏光子が、光線に対する全消光から0°〜15°回れて配置された請求項1記載の装置。

5. 白色光素子の直径が6.72mmである請求項1記載の装置。

6. 光素子が500〜650nmの範囲の半波長を有する請求項1記載の装置。

7. 光素子が多色であり、フィルターにより白色光源となる請求項1記載の装置。

8. 検出器が単一のフォトダイオードである請求項1記載の装置。

9. 検出器がフォトダイオードアレイである請求項1記載の装置。

10. 検出器が本発明に適用される請求項1記載の装置。

11. 光線が、偏光子を透過して白偏光される請求項1記載の装置。

12. 入射光線と検出器の角度がほぼ等しい請求項1記載の装置。





(i) ガラス、プラスチック、シリコンおよび珪素シリコンから選ばれる基

(ii) 酸化状態、シリコン/二酸化硅素複合材、チタン酸塩、炭化法等、ダウ・モント、酸化カドミウムおよび酸化チタンから選択される原料の土質、

(注)高分子シラン、シロキサン、複合シリカテックスおよびデンドリマーから選ばれる任意の組み合わせ、および

(iv) 被検体に対して特異的な結合能。

4-1. 光学部材がガラスであり、屈折率シリコン層の厚さが900~1000  
nmであり、注ガラス上に配設されたアルミニウム層の厚さが1000~2100  
nmであり、酸化亜鉛、シリコンに酸化亜鉛を添加剤、チタン酸塩層または二  
酸化チタン層の厚さが460~3200nmであり、付属図が厚さ90~110nmの  
二酸化チタン・ミリアルチン・シリコン層であり、覆層材が厚さ30~60nmの硬  
質膜である本発明は、3月14日刊の刊行。

42. 光学活性が原因のシリコンであり、酸化は高層、シリコンに二酸化炭素を含む層、タングステン層または二酸化チタン層の厚さが480〜520Åであり、付着層が厚さ90〜110ÅのT層は枝アミノアルキルシロキサン層であり、厚さが厚さ30〜60Åの元素層である結晶化3層または40程度の装置。

4.3. 光学基板がガラスであり、偏光性シリコン層の厚さが900~1000 nmであり、窒化珪素膜、シリコンジエチル窒化物膜、チタン酸塩または二酸化チタン層の厚さが450~520 nmであり、付層膜が厚さ90~110 nmの二酸化チタンとミノアルキルシリコン層であり、導電膜が厚さ30~60 nmの窒化チタンと窒化シリコン層であり、厚さは40 nm以下の積層。

4.4. 光學系はガラスマスクであり、無定形シリコン層の厚さ $900 \sim 1000 \text{ \AA}$ であり、酸化硅素層、シリコン/酸化硅素混合材層、チタン酸層または二酸化チタン層の厚さが $480 \sim 620 \text{ \AA}$ であり、竹炭層の厚さ $90 \sim 110 \text{ \AA}$ の1層分は炭化ミノアルキルシリコン層であり、受光部が厚さ $30 \sim 60 \text{ \AA}$ の1層分より厚さ $390 \text{ \AA}$ の $10 \sim 12$ 層の炭層。

5.2. 主体が光感受性素因を保持するか、またはそれ自体が光力に感応であるかという5.1に就く答覆。

3. 5. 互体がガラスおよびプラスチックから成る群から選択され、その表面に特定のシリコン層をなすことによって光活性表面が形成される請求項1に記載の装置。

3.4 光學活性天然の甲殻系体のシリコンまたは金属を含む試料第5.1記載の  
装置。

5.5. 金銀を含む基体が固定形シリコン膜をさらに具有する請求項5に記載の装置。

5日、五体の上面に付着し得る光学材料を含んで被上面に付着した反射防止層、および被上面から最も離れた位置に配設された材料であって、被浸漬液中の被物体に対して決定的に結合する材料から選択される受容部をさらに具備する装置であることは上記記載の通りである。

57. 反射防止層が酸化異常、シリコン/二酸化塩素被覆材、ダイヤモンド、  
酸化異常、酸化ナトリウムおよびシリコンオキソニトリドから成る群から選択  
される材料を含む請求項56記載の装置。

58 素材がガラス、樹脂シリカ、プラスチック、半導体、セラミックおよび金属からなるおから選択される材料であって、硬質または可塑性であってもよい材料である請求項1または47記載の装置。

より、墨江が光学活性表面を形成するか、またはそれ自体が光学的に活性である請求項46または47記載の装置。

60. 蓋はガラスおよびプラスチックから成る群から選択される材料であつて、蓋はシリコン系または珪素系材料またはイテリウム化合物の化合物。

6.1. 光学応答表面が非結晶性のシリコンまたは金属を含む結晶シリコンまたは4.7記載の装置。

62 全国を含む県が田舎シリコン地をさらに保有する開採地46または47記載の箇所。

45. 光学結晶がガラス状であり、単位セルシリンゴンの厚さが900~1000nmであり、ガラス上のアルミニウム層の厚さが1900~2100Åであり、空化は薄層、シリンゴノ二酸化チタンを含有材料、チタン酸層または二酸化チタンの厚さが480~520Åであり、竹炭層が厚さ90~110Åの二酸化チタン/アルミニウム/シリンゴノ酸層であり、炭素層が厚さ30~60Åの炭化層であり、炭素層59Åまたは10Åの炭化層の製造。

4 6 五材料、アルミニウム、クロムまたは透明な伝導性化合物を含む導電性金属膜、および非晶シリコン膜を有し、前記金属膜が非晶シリコン膜に隣接した多層膜体を形成する基板体の光学的反射率を調整。

47. 各材料およびその材料に因致した不定形シリコンを含有する炭酸体の  
火気アッセイ用装置。

18. 基板の上部面に付着し得る光学材料を含有する膜上部面に付着した反射防止層、および膜上部面から最も離れた位置に配設された材料であって、該液体中の試検体に対して特異的に適合する材料から選択される受容材をさらに含有する請求項4または5に記載の装置。

49. 付録表が元資料と受容材の間に介在する請求項48記載の装置。

50. 要するに光線に露光して解1色を得た後、かつ、解1色とは異なる合成成分溶液を塗布するかまたは該結晶を含有する溶液の乾燥膜を以て面上に30°もしくは2×10<sup>3</sup>回転するときに第1色と異なる少なくとも1つの光波長の強度を有する第2色を光線に露光して定色する光学活性性を有する媒体を具備する該媒体の存在に比例して色度値を算出する。

5.1. 突き当たる光線に吸収して第1世を発生し、かつ、第1世とは異なる台成反応基を有するかまたは化学活性表面上に増殖体が存在するとともに同時に吸収して第1世に比し異なる光長かつよりつづの光波長の吸収を有する第2世代を発生する化学活性表面を有する基板を保持し、該基板がガラス/樹脂成形コンパウンドまたはプラスチック/無機シリコン複合材料から選ばれる材料である増殖体の存在をたばきの必要成分。

6.3 試験試料が下記の中から選択される様式項3.6記述の方法。

尿、血尿、血精、骨髓炎、疝气、会阴、唾液、泌尿生殖道分泌液、其他排泄物、心脏及肺部、胃及肠道、四肢关节处、皮肤分泌物、随汗液排出物、肠管及盲肠分泌物等。

5.4. 放牧条件下での群から選別される頂頂法 39 記載の拡張:  
連綿型型群 R、RSV、ラミア型、1または2以上のヘパチス抗原、H  
AV、HDV、HCV、HDVもしくはHCV、1または2以上のHIV抗原、  
LPS抗原、ラミア型に対して特異的なLPS、ヘパチス、HAY、HBV、  
HCV、HDVもしくはHFEVに対する1または2以上の抗体、HIVに対する  
1または2以上の抗体。

65. 基盤が、成産試験の付合を促進する非特異性タンパク質層をさらに共有する増産増産細胞の存在。

66. 基性が、番号の発生を改良する非特異性タンパク質をさらに具有する  
請求項39記載の発明。

67 試液体の颜色が変色、ELISA、RIAまたは蛍光もしくは化学発光によって検出され、請求項55または66記載の装置。

68. 被検体が、基体との本質的相互作用によって捕獲される神楽場S9記  
載の装置。

6.9. (i)光学的活性性に対する阻力的な相互作用による阻力の付着を阻害する  
鎖形成立ラジカル種、溶分ラジカル種、分子内重合および分子間ラジカル種  
がビニルラジカルから成る群から選択的に自己重合および(ii)ラジカル種が  
ラジカル種から成る群から成る群はグラムの特性がラジカル種に依存する。  
7. (i). 阻力的な相互作用を阻害する試料を、その特性(α)および(β)をさらに  
阻害するラジカル種に依存する試料を、その特性(α)および(β)をさらに  
阻害するラジカル種に依存する試料を、その特性(α)および(β)をさらに

(i) 光学活性表面に対する結水的相互作用による荷電の付着を促進する異形成  
ポラテックス、高分子ロキサン、分子自己集合性高分子、異性高分子

よびデンドリマーから成る骨から選択される付属器および(11)の特殊生？  
シバク留置:

7: 技術が LPS または主要な外膜タンパク質である請求項 6 または 7  
0 記載の装置。

72. 発生源が黄色であるか、ELISA、RIAまたは蛍光もしくは化学発光から発生される蛍光6リまたは70nm程度の波長。

7.3. 被吸体が光学活性表面へ非特異的に吸着される時吸着量より記数の方法

74. 下記の工程(1)~(4)をたてつらミグアもしくはブラム酸塩バクテリア

**抗聚の測定方法:**

(1)被検体を加熱すると析出される試料を抗原抽出試液に混合することによつて抽出効率が50～100%間おこない。

(1) 事の最終的なpHを7.0~7.5に調整するために一定量の中和緩衝液  
を加し、

(iv) 光活性表面上の試料スポットに2次抗体複合体を1~10分間接触させ、洗淨と乾燥処理をおこない、

(イ) 基板を室温で光学活性液面と10～15分間接触させた後、洗浄と乾燥処理をおこない、次いで、

(vi) 染色を測定する。

75. 食料が干渉物質によって引き起こされる諸事項74記載の方法。

76. 両色をエリブソメーター、比較エリブソメーター、薄膜アナライザーまたは偏光計によって検定する請求項74記載の方法。

77. 塩化試液が、ケノアメシコール酸(CDOC)を約0.1%含有するリ  
ン酸塩類前液塩水から成り、NaOHで最終pHが約11.5になるようにアル  
カリ化された試薬であるため、74記載の方法。

7月 中和試薬がリン酸塩緩衝液である請求項74記載の方法。

79. 下記の工段(i)および(ii)を含む化学反応の分枝法:

(1) 図 1 を、光子試験面に對してあらかじめ決められた電圧で抽出器に  
行に充電させ、次いで、

(ii) 未反応の光子は鏡面を用いて予備検出器の励起光子を入射光に対してゼロに  
 フォットする、

B0. 反磁性錯体、光学的活性、および遊離光線による励起によって変光特性を生ずる錯体を見出し、錯体特性が、デンドリマー、重合剤分子、分子自己集約性高分子、高分子シロキサンおよび陽洞性エラステックスから成る群から選択される材料を含む付属物無し、また、錯体特性が、固定化された錯体膜層化剤に対して導電性の基底膜を付与し、さらに、錯体特性の光学的特性の可逆性を高める、錯体膜の存在または膜の抽出位置。

図 1. 放射照射による化学変化。および適量光線による酸化によって反応点  
号を発生する際を示した例。炭素材料が、酸化後、シリコン／二酸化ケイ酸複合  
体、シリコン化合物ナノド、酸化チタン、チタニウム、ゲルマニウム、ジ  
ルコニウム化合物および白金に置きかえられる間から選択される材料を含む光学膜  
または入射層を作り、照射で脱離された材料は防止するために避けた。炭素材料が  
固定化された電気絶縁物に対して高電位の帯電層と材料と、また、炭素材料が  
低電位の相溶性を高める。被照射の存在または欠きの防止論議。

8-2. 反折性固体、光学媒体。および導電性光導による回路によって電界形成を起す等の機能を実現し、該媒体が、チンドリマー、結晶高分子、分子自己集合性高分子、高分子シロキサンおよび液晶性有機化合物から成る群から選択される材料を含む有機体を有し、また、該媒体が、炭化水素、シリコンに置換化は有機物、シリコンオキシニトリド、二硫化チタン、チタン酸塩、ダイヤモンド、ジコニウム触媒および炭化水素から成る群から選択される材料を含む光学導電または反折性を有し、さらに、導電媒体が、単結晶シリコン、ガラス、ガラス/炭化シリコン複合材、全量、半導体、多結晶性シリコンおよびこれらの複合材料から成る群から選択される材料から成り、該固体が陽極光の反射を起すものであることを規定され、さらにまた、該媒体が、陽極光または紫外光に露光

計して高圧白の超短光線を付与すると共に、蛍光信号の消滅性を高める。蛍光体の存在または量の検出装置。

83. 里光輝雄が、生物学的に高性な受容時に導入された薬料である脂承法5  
0から82いずれかに記載の装置;

8.4. 主成分が、デンドリマー、環形高分子、分子自己集合性高分子、或分子  
シロキサンおよび環形成性ナックスから成る群から選択される材料を含む時  
要を要する請求項8.1から8.2に於てに記載の装置。

85. 主成分が、酸化チタン、シリコン系二硫化物を含む、シリコン系キシニトライド、二酸化ナタン、ナタン酸塩、ダイヤキンド、ジルコニウム酸塩または酸化チタンから成る群から選択される材料を含む光学膜または入射面を有する被覆膜と0から82いずれかに記載の装置。

88、文部省が、準物品にシリコン、ガラス／紙成形シリコン複合材、セラミック、多結晶性シリコン、ガラス、金属およびこれらの複合材から成る部材から選別される材料である第3項80から82いずれかに記載の装置。

と 7. 空間体が光反射性であるとき (8) も記載の公証。

83. 性腺は受胎する受胎期であつて、胚体に対して特異的に対応するパートナーを含む受胎層をさらに具有する胚体は80から82に一般的に記載の胚E.

品目、受容態次の群から選択される物質から形成される請求項8と記載の装置：抗酸、抗体、オリゴヌクレオチド、チロシン阻、酵素、酵素基質、バクテリア、細菌体及び、細菌分泌産物、核酸、ポリサッカライド、脂質、タンパク質、非水化物、金属、ウイルス、ホルモン、およびこれらの物質に対するレセプター。

と、結核菌、抗体、抗原、酵素、ホルモン、ポリサッカライド、タンパク質、脂質、脱水化合物、高割合より極微から成る固から選出される物質である請求項6)から8)2いずれかに記載の装置。

91. 吸液体が受容料と2次結合基素との間に介在された過渡現象の検

四、

92. 2次結合試薬が実効濃度を含有する請求項91記載の装置。

93. 横山園および光源が、試料支持体に対して互角座で配置された請求項8  
()から82いずれかに記載の装置。

94. 光澤が單色性または多色性である諸試料5個から8個いずれかに上記の装置。

95. AR型が、発光管に対して特異的な励起波長を発生させるように選定される端項80から82いずれかに記載の装置。

96. 入射光と鏡面との角度が等角度である球面鏡80から82いずれかに記述の要。

97 禁止器が試験面に對して位置の角度で配置された請求項80から82  
いづれかに記載の装置。

98. 下記の工程(I)および(II)を含む試料中の物質体の存在またはその検出を:

(1) 利用法図解、光信号発信、および電場光変調による励起によって蛍光発光を生ずる装置を制御しこの場合、被変換体は、デンドリマー、配型高分子、分子自己集合性高分子、高分子シニクサンおよび膜形成性ラテックスから成る群から選択される材料を含む付随体を用いる。また、蛍光信号の増強性と励起率を高める。ただし、

(II) 該支筋におよび被覆体を形成片に含み得る塩素を、該被覆体と支筋体との相互作用によって支筋体と被覆体とに生じ得る電位差を生ぜしめる炭素材において接触せらる。

99. 該校を校舎町と2次組合地区との間に合算させる請求項98記載の方法。

100. 該族体をその結合性によって選択的に検出する前項第98記載の方法。

101. 異様体を、管容材に対する同所発生試薬との比較によって検出する例

